

Vol. 35, No. 2.

March, 1942.

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; NOBORU ARIYAMA, Niigata; AKIJI FUJITA, Tokyo; KIKO GOTO, Kyoto; SHIGERU TODA, Hoten; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHICO KOIDZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; HAZIME MASAMUNE, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; SHIGEO SUZUKI, Kagoshima; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUUJI SUYEYOSHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Taihoku; SENJI UCHINO, Sendai; TOYOO UCHINO, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

TOKYO

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY,

11 Itchome Kagacho, Ushigome.

Price: \$6.00 per volume.



ÜBER DAS SCHICKSAL DES PENTAOXY-BUFOSTANS IM MEERSCHWEINCHENORGANISMUS.

VON

KANZI IWAKI.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut Okayama.
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

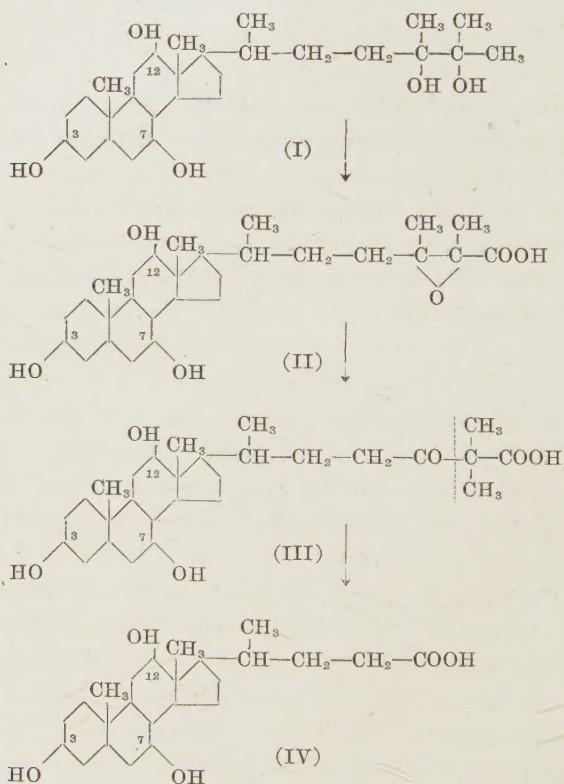
(Eingegangen am 4. November 1941)

Auf Grund der Tatsache, dass die Trioxy-bufo-sterocholsäure im Meerschweinchenorganismus in Cholsäure und weiter in Desoxycholsäure verwandelt und im Harn ausgeschieden wird (Iwaki 1941), wurde wahrscheinlich gemacht, dass nicht nur die höhere Gallensäure, wie Trioxy-bufo-sterocholsäure sondern auch die Steroide wie Pentaoxy-bufostan im Tierorganismus in kohlenstoffärmere Gallensäure wie Cholsäure oder Iso-cholsäure (Ohta 1939) von 24 Kohlenstoffatomen übergeführt werden konnten, die als Bestandteile der Galle der verschiedenen Tiere vorkommen.

Obwohl die chemische Konstitution der verschiedenen Steroide bereits festgestellt wurde, wurde aber ihr Schicksal im Organismus noch wenig geprüft. Somit wurde Pentaoxy-bufostan $C_{28}H_{50}O_5$ den Meerschweinchen verabreicht und deren Harn u. Galle untersucht, welch letztere nach Imai (1937) u. Iwaki (1941) eigentlich weder Cholsäure noch Desoxycholsäure enthalten sollte. Aus 24,65 Liter Harn von 184 Meerschweinchen, denen insgesamt 21,0 g Pentaoxy-bufostan verabreicht wurden, wurde Cholsäure rein erhalten, während aus der Galle (250 ccm) außer eigentlicher Chenodesoxycholsäure und 3-Oxy-7-ketocholansäure nur unverändertes ursprüngliches Pentaoxy-bufostan erhalten wurde.

Diese Tatsache zeigt, dass das verabreichte Pentaoxy-bufostan im Meerschweinchenorganismus in Cholsäure übergehen dürfte und zwar in der Weise, dass sich das Pentaoxy-bufostan (I) erst unter Methyloxydation (II) dann unter Pinakolinumlagerung nach Shimizu u. Kazuno (1940) in Monoketo-trioxy-isosterocholan-

säure (III) umlagert und weiter unter folgender β -Oxydation abgekürzt wird, um in Cholsäure (IV) verwandelt zu werden, was dadurch unterstützt wird, dass dieses Pentaoxy-bufostan experimentell durch Oxydation unter Pinakolinumlagerung in Monoketo-trioxy-isobufostan verwandelt wird, wie Kazuno (1940) in seinem Versuch nachgewiesen hat.



Auf diese Weise dürfte die Cholsäure im Harn des Meerschweinchens aufzufinden sein. Diese Tatsache dürfte höchstwahrscheinlich zeigen, dass das Pentaoxy-bufostan $\text{C}_{28}\text{H}_{50}\text{O}_5$, eine Zwischenstufe des Ergosterins, zu einer Oxy-sterocholansäure, weiter zu einer Oxycholansäure ist.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

1,0 g Pentaoxy-bufostan vom Schmelzpunkt 172° wurde in 3 ccm absolutem Alkohol gelöst und mit 150 ccm Olivenöl verdünnt, bis die Lösung 0,75% davon enthielt, und weiter durch Abdampfen vom Alkohol befreit. Von dieser Lösung wurden den kräftigen gesunden Meerschweinchen vom Körpergewicht 400–600 g, die eine Woche lang mit einer bestimmten Nahrung (Okara u. Gemüse) gefüttert worden waren, 2 ccm pro kg Körpergewicht und pro Tag 21 Tage lang in die Bauchhöhle einverleibt. Während des Versuches wurde der Harn des Versuchstieres jeden Tag durch Katheterisierung gesammelt und betrug insgesamt 24,65 Liter. Zum Versuch wurden 184 Meerschweinchen gebraucht. 2 Tage nach der letzten Injektion wurde die Gallenblase jedes Versuchstieres herausgenommen und die Galle gesammelt. Sie betrug insgesamt 250 ccm. Die dabei verabreichte Gesamtmenge an Pentaoxy-bufostan betrug 21,0 g.

1). *Galle.*

Die gelblich klare, schwach alkalische Galle wurde durch Alkohol vom Mucin und dann durch Abdampfen vom Alkohol befreit. Dabei schied sich eine gelblichweisse krystallinische Masse aus. Nach dem Filtrieren wurde die krystallinische Masse und das Filtrat getrennt behandelt.

Diese krystallinische Masse wurde nach dem Trocknen einige Male mit Petroläther digeriert, um das Fett zu beseitigen, und wieder in trocknem Äther digeriert, um den Farbstoff zu entfernen. Diese Masse wurde nach dem Trocknen aus Essigäther umkrystallisiert. Schmelzpunkt 165–168°. Ausbeute 0,6 g. Der Krystall wurde aus Alkohol-Wasser umkrystallisiert. Prismatische Nadeln vom konstanten Schmelzpunkt 172°. Bei Liebermannscher Reaktion zeigt sich eine violettstichige kirschrote Farbe und eine positive Hammarstensche Reaktion. Keine Schmelzpunktdepression mit reinem Pentaoxy-bufostan.

Wasserlösliche Fraktion. Das vom Pentaoxy-bufostan abfiltrierte Filtrat wurde mit Äther erschöpfend extrahiert. Aus

dem Ätherauszug wurde nach dem Abdampfen des Äthers eine braune Masse erhalten, diese völlig getrocknet, erst in Petroläther, dann in getrocknetem Äther digeriert und diese Behandlung einige Male wiederholt, um das Fett und den Farbstoff völlig zu beseitigen. Dabei wurde ein gelblichweisses Pulver erhalten. Diese Substanz wurde aus Essigäther umkristallisiert. Schmelzpunkt 165–168°. Ausbeute 0,4 g. Diese Substanz wurde aus Alkohol-Wasser umkristallisiert. Prismatische Nadeln vom konstanten Schmelzpunkt 172°. Bei Liebermannscher Reaktion zeigt sich eine violettstichige kirschrote Farbe und eine positive Hammarstensche Reaktion. Sie zeigen mit reinem Pentaoxy-bufostan keine Schmelzpunktdepression.

4,630 mg Subst.:	12,290 mg CO ₂ ,	4,410 mg H ₂ O.
C ₂₈ H ₅₀ O ₅	Ber. C 72,04	H 10,80
	Gef. „ 72,39	„ 10,66.

Das verabreichte Pentaoxy-bufostan wird also zum Teil unverändert in der Galle ausgeschieden.

Diese Mutterlauge wurde durch Abdampfen vom Äther befreit und weiter unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure mit Äther erschöpfend extrahiert. Der Ätherauszug wurde mit einer 5%igen Sodalösung ausgezogen, diese Sodalösung unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure mit Äther durchgeschüttelt und der Ätherauszug nach dem Waschen mit Wasser mit Pottasche getrocknet. Nach dem Verdampfen des Äthers wurde der Rückstand mit Petroläther digeriert, um das Fett zu beseitigen, und wieder mit trocknem Äther digeriert, um den Farbstoff zu entfernen. Diese Masse wurde abermals aus allen organischen Lösungsmitteln umzukristallisiert versucht. Dabei wurde leider kein Krystall gewonnen. Somit wurde die Substanz in 5%iger Kalilauge gelöst und auf dem Wasserbade 30 Stunden lang erwärmt und dann filtriert. Das abfiltrierte Hydrolysat wurde unter Ansäuern mit verdünnter Salzsäure mit Äther extrahiert. Der Ätherauszug wurde nach dem Waschen mit Wasser mit Pottasche getrocknet und verdampft. Der Rückstand wurde nochmals gleicher Behandlung unterworfen. Doch wurde wieder kein Krystall erhalten.

2) *Der Harn.*

24,65 Liter des gesammelten gelbbraunen schwach alkalischen Harns vom spezifischen Gewicht 1016–1026 wurden in Zimmer-temperatur mittelst elektrischen Föhns verdampft und im Exsikkator gut getrocknet. Der schwarzbraune Rückstand von 281 g wurde mit absolutem Alkohol unter 5 stündiger Erwärmung auf dem Wasserbade 5 mal extrahiert. Der Alkoholauszug wurde nach dem Abdampfen des Alkohols mit Wasser verdünnt und weiter der Alkohol verdampft. Diese Lösung wurde mit Essigäther 3 mal durchgeschüttelt. Der Essigätherauszug wurde nach Waschen mit Wasser mit Pottasche getrocknet. Der beim Abdampfen des Essigäthers erhaltene schwarzbraune Rückstand wurde in 100 ccm einer 5%igen alkoholischen Kalilauge gelöst und auf dem Wasserbade 3 Stunden hydrolysiert. Vom abfiltrierten Hydrolysat wurde unter Zusatz eines gleichen Volumens Wasser der Alkohol abgedampft, mit verdünnter Salzsäure ausgefällt und die dabei erhaltene gelbliche Fällung gut getrocknet. Die Fällung wurde in Petroläther abermals digeriert, dann mit Äther behandelt und der Ätherauszug nach dem Verdampfen wieder in Petroläther digeriert. Diese Behandlung wurde einige Male wiederholt, um das Fett und den Farbstoff zu entfernen. Der Rückstand wurde in 2%iger Ammoniaklösung gelöst, mit einer 5%igen Bariumchloridlösung ausgefällt und nach einer Nacht abfiltriert.

i) Das Filtrat wurde mit verdünnter Salzsäure angesäuert, die dabei abgeschiedene Fällung in Äther aufgenommen, der Ätherauszug mit Wasser gewaschen, mit Pottasche getrocknet und verdampft. Der Rückstand wurde in Petroläther abermals digeriert. Diese Behandlung wurde einige Male wiederholt, um das Fett und den Farbstoff zu entfernen. Die dabei erhaltene gelblichweiße Substanz wurde aus Essigäther umkristallisiert. Amorphe Masse vom Schmelzpunkt 175–192°. Ausbeute 80 mg. Die Substanz wurde aus Alkohol umkristallisiert, Tetraeder vom Schmelzpunkt 198°. Der Krystall zeigt eine positive Myliussche und Hammarstensche Reaktion. Er zeigt mit reiner Cholsäure keine Schmelzpunktdepression.

4,500 mg Subst.: 11,640 mg CO₂, 3,840 mg H₂O.

C₂₄H₄₀O₅

Ber. C 70,53 H 9,87

Gef. „ 70,55 „ 9,55.

ii) Bariumsalzfällung. Die Fällung wurde mit einer 5%igen Sodalösung auf dem Wasserbade 3 Stunden lang erwärmt, die von Bariumcarbonat abfiltrierte Lösung unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgefällt, die Fällung in Äther aufgenommen und nach Waschen mit Wasser und Trocknen verdampft. Der Rückstand wurde wieder in 2%iger Ammoniaklösung gelöst und unter Zusatz einer 5%igen Bariumchloridlösung ausgefällt und nach einer Nacht abfiltriert.

a) Bariumsalzfällung. Die Fällung wurde in 5%iger Sodalösung auf dem Wasserbade 3 Stunden lang gekocht und dann filtriert. Das Filtrat wurde unter Ansäuern mit verdünnter Salzsäure mit Äther extrahiert, der Ätherauszug nach dem Waschen mit Wasser und nach dem Trocknen mit Pottasche abgedampft. Der Rückstand wurde in Petroläther abermals digeriert, weiter mit Äther behandelt und der Ätherauszug nach dem Verdampfen wieder in Petroläther digeriert. Diese Behandlung wurde einige Male wiederholt, um das Fett und den Farbstoff zu entfernen. Die dabei erhaltene gelblichweisse Masse wurde aus verschiedenen Lösungsmitteln abermals umzukristallisieren versucht. Es wurde kein Krystall erhalten.

b) Das Filtrat. Das von der Bariumsalzfällung abfiltrierte Filtrat wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure mit Äther extrahiert. Der Ätherauszug wurde nach dem Waschen mit Wasser getrocknet und der Äther abgedampft, wobei ein gelbweisser Niederschlag auftrat. Dieser Niederschlag wurde nach dem Trocknen erst in Petroläther, dann mit wasserfreiem Äther digeriert. Diese Behandlung wurde einige Male wiederholt, um das Fett und den Farbstoff zu entfernen. Die gelbweisse Substanz wurde aus Essigäther umkristallisiert. Amorphe Masse vom Schmelzpunkt 172–190°. Ausbeute 30 mg. Die Substanz wurde aus Alkohol umkristallisiert. Tetraeder vom Schmelzpunkt 198°. Der Krystall zeigt eine positive Myliusche und Hammarstensche Reaktion. Er zeigt mit reiner Cholsäure keine Schmelzpunkt-

depression.

4,390 mg Subst.: 11,355 mg CO₂, 3,720 mg H₂O.

C₂₄H₄₀O₅

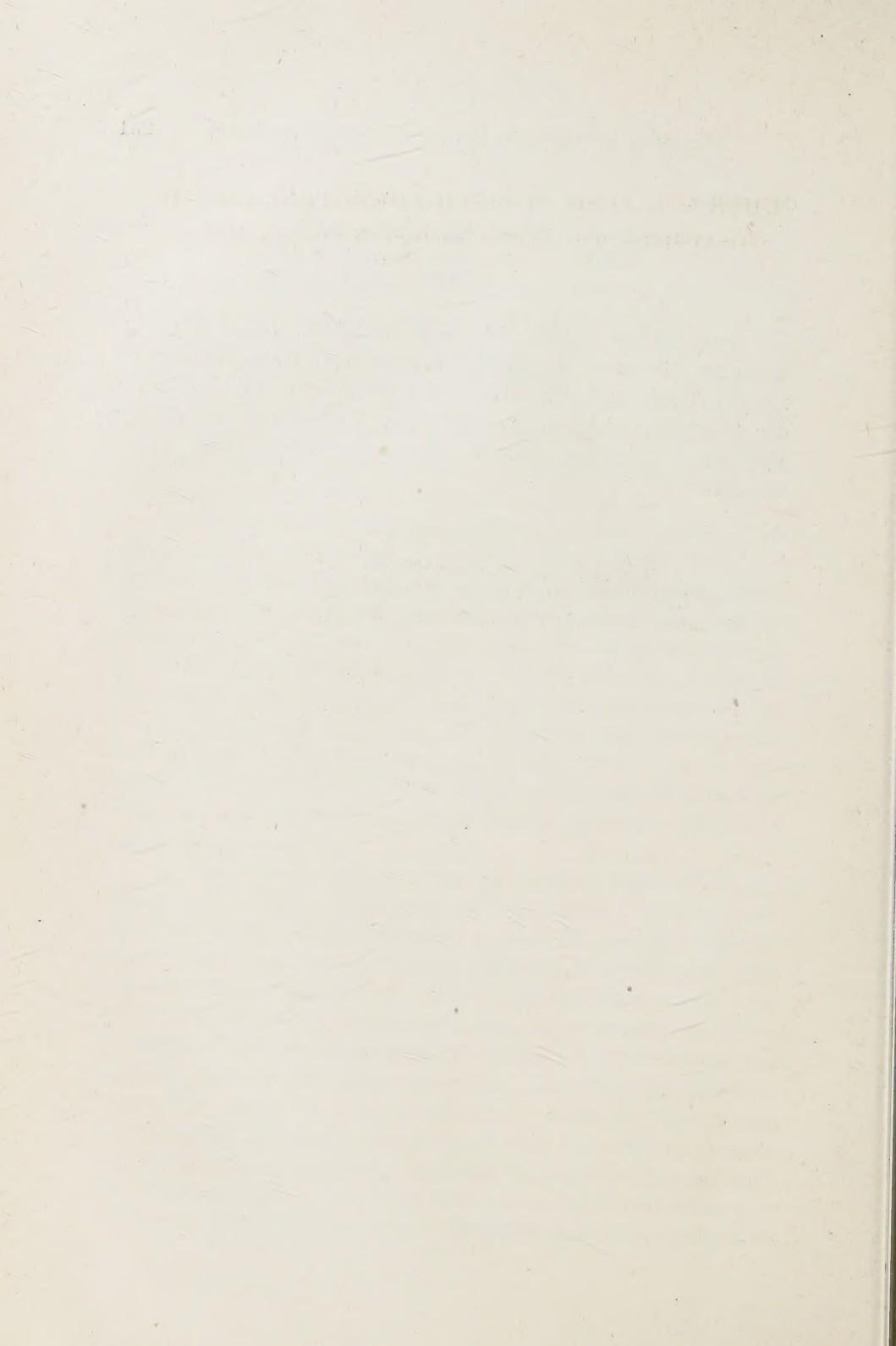
Ber. C 70,53 H 9,87

Gef. „ 70,54 „ 9,48.

Zum Schluss möchte ich nicht verfehlten, Herrn Prof. T. Kazuno für seine freundliche Leitung und Unterstützung bei meiner Arbeit und der japanischen Gesellschaft zur Förderung der wissenschaftlichen und industriellen Forschungen für die zur Verfügung gestellten Mitteln meiner herzlichen Dank auszusprechen.

LITERATUR.

- Imai, I. (1937) : Z. Physiol. Chem., **248**, 65.
Iwaki, K. (1942) : Jl. of Bioch., **35**, 139, 149.
Kazuno, T. (1940) : Z. Physiol. Chem., **266**, 11.



ÜBER DIE ALLIGATORSCHILDKRÖTENGALLE II. Trioxy-stero- und Trioxy-isostero-cholansäurelakton.

VON

TAKAO SUGANAMI u. KAZUMI YAMASAKI.

(Aus dem Biochemischen Institut Okayama u. aus der Biochemischen Abteilung der medizinischen Schule zu Harbin.)

• (Eingegangen am 4. November 1941)

Vor einigen Jahren wurden zwei Laktone der Sterocholan-säurerreihe in der Alligatorschildkrötengalle von K. Yamasaki u. M. Yuuki (1936) entdeckt; über das Lakton vom Schmelzpunkt 228° wurde dabei nur eine vorläufige kurze Mitteilung gemacht. Durch nachherige Untersuchungen wurde ein Irrtum gefunden. Aus der angesäuerten, frischen Galle wurden zwei ungepaarte, miteinander isomere Laktone von der Formel C₂₇H₄₄O₅ bzw. C₂₈H₄₆O₅ mit Chloroform direkt ausgezogen; das eine ist ganz identisch mit dem bereits berichteten Trioxy-sterocholansäurelakton vom Schmelzpunkt 208°, das nach der Chloroformausschüttelung durch Hydrolyse der Galle erhalten wurde und sogar den Hauptbestandteil der Galle ausmacht.

Das andere, neue Lakton wir wollen es als Trioxy-isostero-cholansäurelakton bezeichnen, das aus der Essigäthermutterlauge des Laktons vom Schmelzpunkt 208° hergestellt wurde, ist gesättigt und schmilzt bei 220° unter charakteristischem Sintern bei 130°. Die aus dem Lakton hergestellte Säure C₂₈H₄₄O₆ (od. C₂₇H₄₆O₆) schmilzt bei 205° und ihr Methylester bei 228°, welch letzterer mit dem bereits irrtümlich angegebenen Lakton vom Schmelzpunkt 228° keine Schmelzpunktdepression zeigt; der letztere ist also ein Kunstprodukt, der Methylester der Säure.

Interessant ist, dass das isomere Lakton eine hohe spezifische Drehung: $[\alpha]_D = +68,97^\circ$ und sein Methylester dagegen einen fast halben Wert: $[\alpha]_D = +35,25^\circ$ hat, was beim Lakton vom Schmelzpunkt 208° nicht der Fall war und noch ungeklärt bleibt. Die

Säure kehrt sich in warmer Chloroformlösung bei Vorhandensein von wenig Salzsäure sogar in das ursprüngliche Lakton um.* Die Laktonisierung der Säure findet auch beim Kochen der Säure bzw. des Methylesters in konzentrierter Ameisensäure unter Bildung von Triformyllakton statt. Der so ziemlich leichte Abschluss des Laktonringes könnte darauf hinweisen, dass eine Alkoholgruppe des Laktonmoleküls zur Karboxylgruppe δ -ständig ist.

Was die Wirkung der fünf Sauerstoffe des neuen isomeren Laktons betrifft, so erwiesen sich abgesehen von denen, die den Laktonring schliessen müssen, drei davon als sekundäre Alkoholgruppe, indem das Lakton einen in glitzernden, langen Prismen kristallisierenden Triformylester vom Schmelzpunkt 267° und ein Triketolakton vom Schmelzpunkt 216° lieferte, das ein Trioxim bilden kann.

Wie später bei der Besprechung des Laktons vom Schmelzpunkt 208° noch die Rede sein soll, konnte der Laktonring des Ketolaktons bzw. der ursprünglichen Laktons durch Chromsäureoxydation bei Zimmertemperatur oder bei 40° geöffnet und dabei in ziemlich guter Ausbeute eine Tetraketosäure vom Schmelzpunkt 188° gebildet werden, deren Methylester seinerseits wider Erwarten die Bildung eines Tetraketoxims als schwerer, eines Triketoxims als leichter erscheinen liess, was zu bedeuten hat, dass die bei der Öffnung des Laktonringes gebildete Carbonylgruppe eine reaktionsfähiger sein und schliesslich wieder laktonisiert werden dürfte.

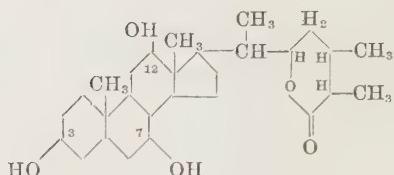
Das Lakton vom Schmelzpunkt 208° , Trioxy-sterocholansäure-lakton $C_{27}H_{44}O_5$ bzw. $C_{28}H_{46}O_5$ lieferte einen Triformylester vom Schmelzpunkt 231° , was wohl zusammen mit der Tatsache der bereits berichteten Triketolaktonbildung (1936) zeigt, dass drei von den fünf Sauerstoffen im Molekül dieses Laktons als sekundäre Alkoholgruppe funktionieren. Bei der vorausgegangenen Mitteilung (1936) war ungeklärt geblieben, dass das Lakton bei milder Chromsäureoxydation gleichzeitig ein Triketolakton $C_{27}H_{38}O_5$ bzw. $C_{28}H_{40}O_5$ und eine Tetraketosäure $C_{27}H_{38}O_6$ od. $C_{28}H_{40}O_6$ in fast gleicher Ausbeute geliefert hatte. Das Ketolakton

* Unter gleicher Bedingung wurde die Umkehrung des Laktons vom Schmelzpunkt 208° beobachtet (Kim 1938).

seinerseits wurde durch weitere Oxydation mit Chromsäure sogar in die Tetraketosäure vom Schmelzpunkt 215° verwandelt. Neuerdings ist bekannt geworden, dass das Mengenverhältnis dieser beiden Reaktionsprodukte von der Stärke oder Oxydationsbedingungen bzw. von der Menge der Chromsäure stark abhängig ist; das Trioxylakton lieferte bei der Oxydation mit einem drei Mol Sauerstoff entsprechenden Oxydationsmittel fast ausschliesslich das Ketolakton, während sich bei länger andauernde Oxydation mit überschüssiger Chromsäure, insbesondere bei 40° unter Öffnung des Laktonringes, der Hauptsache nach Tetraketosäure vom Schmelzpunkt 215° bildete. Aus diesen unerwarteten Ergebnissen scheint wohl hervorzugehen, dass wie es bei den üblichen Laktonen der Fall ist, der Laktonring im Essigsäuremedium teilweise geöffnet wird, was beim Lakton vom Schmelzpunkt 208° gut nachweisbar war.* Sogar die Öffnung des Laktonringes durch Chromsäure-Oxydation der den Laktonring schliessenden sekundären Alkoholgruppe wird beschleunigt. Der Umstand könnte wohl dafür sprechen, dass hier nicht ein γ -Lakton sondern ein δ -Lakton vorliegt, was erst durch die neueren Untersuchungen von S. Kanemitsu (1942) endgültig bewiesen wurde.

Aus den elementaren Analysenwerten der vorliegenden beiden Laktone bzw. ihrer Derivate könnten ihre Grundskelette fast zweifellos, wie es bei den meisten Gallensäuren der Fall ist, als ein Cyclopentanoperhydrophenanthrenkern dargestellt werden und ihre drei sekundären Alkoholgruppen den typischen Platz am C₃, C₇ und C₁₂ des Laktonmoleküls nehmen, was aus dem positiven Ausfall der Hammarsten-Yamasaki-Reaktion wohl vermutet werden kann. So könnte man die Konstitutionsformel für die zwei isomeren Lakton mit folgendem Bild annehmen, was in der nachherigen Mitteilung von T. Kanemitsu (1942) ausführlich berichtet werden soll. Für den strukturellen Unterschied zwischen den beiden Laktonen ist aber noch kein Anhaltspunkt zu finden.

* Das gereinigte Lakton wurde aus Eisessig umkristallisiert, worin es ziemlich schwer löslich ist. Aus der Mutterlauge des dabei auskristallisierten Laktons konnte neben dem Lakton die Säure des Laktons (Fp 140) erhalten werden.



BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

*I. Trioxy-sterocholansäurelakton.**Ungepaartes Trioxy-sterocholansäurelakton in der Galle.*

120 g schleimfreie, zu Syrupkonsistenz getrocknete Galle wurden in 1 Liter Wasser gelöst und unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure mit je 500 ccm Chloroform 4 mal geschüttelt; der vereinigte Chloroformextrakt wurde mit je 500 ccm einer 10%igen Bicarbonat- und Sodalösung hintereinander je 4 mal geschüttelt, wobei die schwärzlichen Farbstoffe fast vollständig in Bicarbonatlösung übergingen. Die Chloroformlösung wurde mit Wasser, schliesslich mit verdünnter Salzsäure gewaschen, zu ca. 100 ccm eingeengt und dann mit viel Petroläther vollständig ausgefällt, wobei sich zunächst eine harzige, später sandig werdende Masse abschied. Das abgesaugte gelbbräunliche Pulver betrug 16 g. Es wurde im Soxhletapparat mit Essigester extrahiert und die beim Einengen krystallisierte Trioxy-sterocholansäurelakton-Fraktion (10,4 g) abgesaugt; das Filtrat wurde zur Darstellung eines isomeren Laktons aufbewahrt.

Das Trioxy-lakton wurde wieder im Soxhletapparat mit Essigester extrahiert. Der Extrakt wurde eingeengt, wobei 4 g fast reinen Trioxy-laktons erhalten wurde, aus dessen Filtrat durch weiteres Einengen noch 2,5 g von fast reinem Lakton gewonnen wurden. Aus dem letzten, eingeengten Filtrat wurde ca. 1 g isomeres Lakton erhalten, das mit der isomeren Laktonfraktion vereinigt wurde. Die Substanz wurde aus Aceton-Wasser mehrmals umkrystallisiert. Kurze, durchsichtige, an der Luft matt werdende Prismen.

Spezifische Drehung: 0,1762 g Subst. in 10 ccm abs. Alkohol,

$$L=2 \text{ dm}, \quad \alpha = +1,10^\circ \quad [\alpha]_D^{20} = +31,19^\circ$$

3,600 mg Subst.: 9,535 mg CO₂, 3,255 mg H₂O.

C ₂₈ H ₄₀ O ₆	Ber. C 72,66	H 10,03
	Gef. „ 72,24	„ 10,12.

Oxydation des Laktons.

1. Tetraketosäure (Fp 215°) aus dem Triketolakton. 60 mg Ketolakton (Fp 306°) wurden in 0,6 cem Eisessig suspendiert, wozu 1 cem einer 10% igen Chromsäure-Eisessiglösung bei Zimmer-temperatur zugesetzt wurde. Nach einigen Stunden wurde das Oxydationsprodukt mit Wasser ausgefällt, welches sich dabei krystallinisch abschied. Die abgesaugten Krystalle wurden in Sodalösung aufgenommen und nach dem Filtrieren mit verdünnter Salzsäure ausgefällt. Die dabei krystallinisch abgeschiedene Säure (Fp 200°) wurde aus verdünntem Alkohol oder Aceton-Wasser umkrystallisiert. Prismatische Nadeln vom Schmp. 213–215°. Keine Schmelzpunktdepression mit der aus dem Trioxy-lakton direkt erhaltenen Ketosäure. Liebermannsche Reaktion: orange-rot mit intensiver Fluoreszenz.

4,185 mg Subst.: 10,835 mg CO₂, 3,175 mg H₂O.

C ₂₈ H ₄₀ O ₆	Ber. C 71,14	H 8,53
	Gef. „ 70,61	„ 8,49.

2. Tetraketosäure aus Trioxy-lakton. 0,3 g Lakton wurde in 3 cem Eisessig suspendiert und mit 3 cem einer 10% igen Chrom-säurelösung versetzt und nach 3 Stunden mit Wasser ausgefällt, wobei die Reaktionsmasse krystallinisch abgeschieden wurde. Aus-beute 0,2 g. Diese Masse wurde in verdünnter Ammoniaklösung suspendiert und mit Chloroform geschüttelt. Aus der Chloroform-lösung wurden nur 20 mg Ketolakton gewonnen, während aus der Ammoniaklösung 0,15 g der Tetraketosäure vom Schmelzpunkt 215° erhalten wurde.

Trifomylester des Trioxylaktons.

0,1 g Lakton wurde in 3 cem frisch destillierter Ameisensäure 7 Stunden lang gekocht. Das Reaktionsprodukt wurde mit Wasser ausgefällt, wobei sich eine pulverige Masse abschied. Diese wurde einmal mit kaltem Methanol digeriert und dann mehrmals aus Methanol oder Methanol-Essigäther umkrystallisiert. Prismen vom

Schmelzpunkt 229–231°. Der Ester ist in Methanol schwer, in Essigäther leicht löslich, was ein ganz umgekehrtes Löslichkeitsverhältnis gegenüber dem ursprünglichen Lakton darstellt.

3,988 mg Subst.: 9,969 mg CO ₂ , 2,947 mg H ₂ O.	
C ₃₁ H ₄₆ O ₈	Ber. C 68,09 H 8,49
	Gef. „ 68,17 „ 8,27.

II. *Trioxy-isosterocholansäurelakton.*

Das vom *Trioxy-sterocholansäurelakton* abfiltrierte, eingeengte Essigätherfiltrat wurde mit Petroläther vollständig ausgefällt und die abgesaugte, gut getrocknete, sandige Masse, die 2,8 g betrug, im Soxhletapparat mit Essigäther extrahiert. Der bräunlich gefärbte Extrakt wurde eingeengt, wobei die Lösung gallertig erstarnte. Durch mehrtägiges Stehen wurde diese Masse mit Krystallen durchsetzt und dann unter Zusatz von wenig Essigäther abgenutscht. Der Rückstand wurde wieder mit Essigäther digeriert und abgesaugt. Ausbeute 1,1 g. Die Krystalle schmolzen etwa bei 120–130° unter starkem Aufschäumen, was das leicht erkennbare Merkmal der Isolaktonfraktion darstellt. Aus dem anderen Filtrat des *Trioxy-sterocholansäurelaktons* wurde noch die Isolaktonfraktion erhalten. Die gesamte Ausbeute betrug insgesamt ca. 3,3 g. Der Krystall wurde mehrmals aus Essigäther, verdünntem Methanol oder Alkohol umkrystallisiert. Er schmilzt unter starkem Aufschäumen bei 219–220°. Glänzende schmale, sechsseitige Tafeln.

Seine alkoholische Lösung verbrauchte nicht das Alkali (Penolphthalein) und zeigte bei Liebermannscher Reaktion einen ähnlichen Farbenumschlag wie beim *Trioxy-sterocholansäurelakton*: rosa-bräunlichrot. Legalsche Probe: negativ (in Pyridin). Bei der Hammarsten-Yamasakischen Reaktion zeigte er nicht eine charakteristisch blaue, sondern eine schwach violette Farbe mit stark grüner Fluoreszenz und doch spektroskopisch mit einem deutlichen Band um die D-Linie.

Spezifische Drehung: 0,0435 g Subst. in 10 ccm abs. Alkohol,

$$L=2 \text{ dm}, \quad \alpha = +0,60^\circ \quad [\alpha]_D^{30^\circ} = +68,97^\circ$$

2,960 mg Subst.: 7,550 mg CO₂, 2,650 mg H₂O.

C ₂₈ H ₄₆ O ₅ · H ₂ O	Ber.	C 69,94 H 10,07
	Gef.	,, 69,56 ,, 10,02.

Triformylester des Iso-laktons.

1 g Lakton wurde in 10 ccm frisch destillierter Ameisensäure 5 Stunden lang erhitzt. Die Reaktionsflüssigkeit wurde genau wie beim Trioxy-sterocholansäurelakton bearbeitet und der erhaltene Ester aus Alkohol-Essigäther mehrmals umkristallisiert. Ausbeute 0,6 g. Glänzende prismatische Nadeln vom Schmelzpunkt 262–267° (schwache Sinterung bei 250°).

3,130 mg Subst.: 7,770 mg CO₂, 2,360 mg H₂O.

C ₃₁ H ₄₆ O ₈	Ber.	C 68,09 H 8,49
	Gef.	,, 67,70 ,, 8,44.

Der Ester ist in Essigäther ziemlich leicht, in Alkohol schwer löslich; diese Löslichkeitsverhältnisse sind die umgekehrten gegenüber dem freien Lakton.

Tetraoxysäure aus Iso-lakton.

0,1 g Lakton wurde in 8 ccm warmer *n*-Natronlauge gelöst und nach Erkalten unter Ansäuerung mit Chloroform geschüttelt. Die in der Zwischenschicht abgeschiedenen Krystalle wurden abgesaugt. Tafeln vom Schmelzpunkt 205° (Aufschäumen). Ausbeute 45 mg. Der Schmelzpunkt der so erhaltenen Säure wurde durch weitere Umkristallisation nicht mehr gesteigert. Sie ist sehr leicht löslich in Sodalösung und gegenüber dem Lakton in Chloroform ziemlich schwerer löslich. Das bei 110° getrocknete Präparat zeigte folgende Analysenzahlen:

4,667 mg Subst.: 11,910 mg CO₂, 4,280 mg H₂O.

C ₂₈ H ₄₆ O ₆	Ber.	C 69,94 H 10,07
	Gef.	,, 69,61 ,, 10,27.

Methylester der Säure. 0,1 g der Säure wurde in üblicher Weise mittelst ätherischer Diazomethanlösung methyliert und aus verdünntem Methanol mehrmals umkristallisiert. Schmp. 227–228° (Sinterung bei 217°).

Spezifische Drehung: 0,695 g Subst.: in 10 ccm abs. Alkohol,
 $L=2$ dm, $\alpha = +0,49^\circ$ $[\alpha]_D^{20} = +35,25^\circ$.

4,801, 4,999 mg Subst.: 11,890, 12,380 mg, CO_2 , 4,300, 4,470 mg H_2O .
940,0 mg Subst.: bei 130° 6 Stunden getrocknet, Gewichtsverlust 3,9 mg.
 $\text{C}_{20}\text{H}_{50}\text{O}_6 \cdot \text{H}_2\text{O}$ Ber. C 67,91 H 10,23 H_2O 3,51
Gef. „ 67,56, 67,59 „ 10,03, 10,01 „ 4,15.

Triformylester aus dem Methylester.

0,2 g des Esters wurden in 3 ccm frisch destillierter Ameisensäure 4 Stunden lang erhitzt und wie vorher behandelt. Der so erhaltene Ester wurde aus Essigäther umkristallisiert. Schmpf. $260-261^\circ$. Der Ester zeigte mit dem Triformylester des Iso-laktons keine Schmelzpunktdepression.

3,370 mg Subst.: 8,360 mg CO_2 , 2,490 mg H_2O .
 $\text{C}_{31}\text{H}_{46}\text{O}_8$ Ber. C 68,09 H 8,49
Gef. „ 67,66 „ 8,27.

Umkehrung der Säure im Lakton.

0,2 g Säure wurden unter gelindem Erwärmen in wenig Natronlauge gelöst, mit Wasser verdünnt; die noch warme Lösung wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure mit Chloroform geschüttelt. Der Chloroformauszug wurde mit 5% iger Sodalösung und mit Wasser hintereinander gewaschen und dann vom Lösungsmittel vollständig befreit. Die getrocknete, krystallinisch abgeschiedene Masse (0,175 g) schmolz bei 208° und wurde aus Essigäther-Methanol oder Methanol-Wasser mehrmals umkristallisiert. Die Krystalle sintern bei 130° und schmelzen bei $216-218^\circ$. Keine Depression mit dem ursprünglichen Lakton.

Spezifische Drehung: 0,0696 g Subst. in 10 ccm abs. Alkohol,
 $L=2$ dm, $\alpha = +0,92^\circ$ $[\alpha]_D^{20} = +66,57^\circ$.

Triketolakton. 0,2 g Lakton in 2 ccm Eisessig wurde mit Chromsäure-Essigsäure (0,2 g CrO_3 in 1 ccm Wasser u. 1 ccm Eisessig) bei Zimmertemperatur oxydiert. Nach 2 Stunden wurde die Lösung mit Wasser versetzt, wobei sich das gebildete Ketolakton sofort gallertig abschied. Die abgesaugte, getrocknete Masse (0,15 g) wurde aus Aceton-Petroläther, aus Alkohol-Wasser, aus

Essigäther oder Chloroform-Petroläther umgefällt, wobei sie nur als körnige Masse erhalten wurde. Schmp. 215–216°. Liebermannsche Reaktion: nur gelb.

3,610 mg Subst.: 9,720 mg CO ₂ , 2,930 mg H ₂ O.	
C ₂₈ H ₄₀ O ₆	Ber. C 73,63 H 8,84
	Gef. „ 73,43 „ 9,08.

Oxim des Ketolaktons. 50 mg Ketolakton wurden mit je 50 mg Hydroxylaminhydrochlorid und Natriumacetat in 10 ccm Alkohol 2 Stunden lang gekocht und dann mit Wasser ausgefällt. Die abgeschiedene Fällung wurde in Alkohol gelöst, mit Wasser gefällt und diese Behandlung mehrmals wiederholt. Amorphes Pulver.

3,403 mg Subst.: 0,2396 ccm N (15°, 764 mmHg).	
3,135 mg Subst.: 0,2254 ccm N (16°, 763 mmHg).	
C ₂₈ H ₄₃ O ₅ N ₃	Ber. N. 8,38
	Gef. „ 8,25, 8,38.

Tetraketosäure.

1) Aus dem Iso-lakton. 0,3 g Lakton in 3 ccm Eisessig wurde mit 3 ccm Chromsäurelösung (0,3 g CrO₃) bei 40° oxydiert und nach anderthalb Stunden mit Wasser versetzt, wobei sich eine krystallinische Masse abschied. Die abgesaugte Masse wurde in Sodalösung aufgenommen und filtriert, wobei sich fast die ganze Substanz löste. Das Filtrat wurde mit verdünnter Salzsäure ausgefällt. Die abgesaugte Masse (0,2 g) wurde aus Aceton-Wasser oder Methanol-Wasser umkristallisiert. Prismatische Nadeln vom Schmelzpunkt 187–188°. Liebermannsche Reaktion: gelb—orange.

3,792 mg Subst.: 9,784 mg CO ₂ , 2,778 mg H ₂ O.	
C ₂₈ H ₄₀ O ₆	Ber. C 71,14 H 8,53
	Gef. „ 70,37 „ 8,20.

Methylester der Säure. Der mitelst ätherischer Diazomethanlösung hergestellte Ester wurde aus verdünntem Methanol mehrmals umkristallisiert. Schmp. 167–168° (Sintern bei 160°). Er zeigte keine Schmelzpunktdepression mit dem unten beschriebenen Ketosäuremethylester (Schmelzpt. 168°), der aus dem Tetraoxysäuremethylester vom Schmelzpunkt 228° erhalten wurde.

2) Aus Ketolakton. 0,11 g Ketolakton in 1 ccm Eisessig wurde mit 0,5 ccm einer 10%igen Chromsäurelösung bei 40° oxydiert. Nach 1 Stunde wurde die Lösung mit Wasser versetzt, wobei sich eine krystallinische Masse abschied. Die abgesaugte Masse wurde in Sodalösung gelöst, filtriert und dann mit verdünnter Salzsäure ausgefällt. Die abgesaugte Masse (0,08 g) wurde aus Methanol-Wasser mehrmals umkristallisiert. Verfilzte, prismatische Nadeln vom Schmelzpunkt 187–188°. Liebermannsche Reaktion: orange. Keine Schmelzpunktdepression mit der aus Iso-lakton gewöhnlichen Tetraketosäure.

Oxydation des Tetraoxysäuremethylester.

0,2 g Ester (F_p 228°) des Trioxy-isosterocholansäurelaktons wurde in 4 ccm Eisessig mit gleicher Menge Chromsäure bei Zimmertemperatur oxydiert und nach einigen Stunden mit Wasser ausgefällt. Die abgesaugte Masse (0,12 g) wurde aus Methanol-Wasser mehrmals umkristallisiert. Schmp. 168–169° (Sinterung bei 160°). Glänzende, breite Tafeln. Liebermannsche Reaktion: stark gelb.

2,065 mg Subst.: 5,380 mg CO_2 , 1,620 mg H_2O .

$C_{29}H_{42}O_6$	Ber. C 71,56	H 8,71
	Gef. „ 71,08	„ 8,78.

Oxim des Ketomethylesters. 45 mg Ester wurden in 5 ccm Alkohol mit je 40 mg Hydroxylaminhydrochlorid und Natriumacetat 7 Stunden lang erhitzt. Das so erhaltene Oxim wurde aus Alkohol mehrmals mit Wasser gefällt. Amorphes Pulver. Schmelzpt. 160°.

4,440 mg Subst.: 0,323 ccm N (18°, 766 mmHg).

4,145 mg Subst.: 0,304 ccm N (16,5°, 769 mmHg).

$C_{28}H_{43}O_5N_3$	Ber. N. 8,38
	Gef. „ 8,60, 8,75.

LITERATUR.

Kim, C. H. (1938): J. of Bioch., **30**, 247.

Kanemitsu, S. (1942): J. of Bioch., **35**, 155, 179.

Yamasaki, K. u. Yuuki, M. (1936): Z. Physiol. Chem., **244**, 173.

STUDIES ON TYROSINASE.

VII. The action of the potatoe tyrosinase on trihydric phenols.

By

HISASI SAITO.

(From the Biochemical Institute, Nagasaki Medical College.
Director: Prof. Dr. T. Uchino.)

(Received for publication, November 4, 1941)

INTRODUCTION.

Pugh and Raper (1927) pointed out that tyrosinase, being allowed to act on phenol, catechol, *p*-cresol and *m*-cresol in the presence of aniline, produces anilino compounds of *o*-quinones as oxidation products. They thus postulated the formation of ortho-quinones from these phenols by the action of tyrosinase. The amount of oxygen, consumed in the enzymic oxidation of phenols, was, however, found by many investigators (Robinson and McCance, 1925; Pugh and Raper, 1927; Kawasaki, 1938; Sasaki, 1940, a) to be one atom more per molecule of substrates than that of corresponding to the formation of *o*-quinones. This probably indicates that *o*-quinones are not the final products of enzymic oxidation of phenolic substances.

Wagreich and Nelson (1936) found that the amount of oxygen required for the oxidation of catechol by tyrosinase is two atoms and that the subsequent addition of aniline is accompanied by the absorption of another atom of oxygen with the formation of anilino-quinone. On the basis of this finding, they suggested that, in the case of catechol oxidation by tyrosinase, 4-hydroxy-1,2-quinone is produced rather than *o*-benzoquinone as an intermediate product, and that hydroxyquinone thus formed then reacts with aniline to produce dianilino quinone. On the other hand, Jackson (1939) examined the action of tyrosinase on catechol as well as 1,2,4-trihydroxybenzene and came to the conclusion that 4-hydroxy-

1,2-quinone can by no means be accepted as an intermediary product of oxidation.

In our laboratory Sasaki (1940, a; 1940 b) investigated thoroughly the enzymic oxidation of catechol, *p*-cresol and homocatechol, especially at a different pH of reaction mixtures as well as with the addition of varying amounts of aniline. She found that with catechol the amount of oxygen consumed is two atoms without aniline and in the presence of the latter three atoms, and that this relationship holds good over the range of pH 4.5 to 7.0. These results accord well with that reported by Wagreich and Nelson. Quite different results were, however, obtained with *p*-cresol and homocatechol. At pH 7.0-9.0 the oxidation of *p*-cresol and homocatechol is accompanied by an absorption of 3 and 2 atoms of oxygen respectively, while at pH 4.0-5.0 the amount of oxygen consumed is always one atom less than at the alkaline reaction, i.e. in the case of *p*-cresol two atoms and in the case of homocatechol only one atom. Upon addition of aniline another atom of oxygen is taken up at the acid reaction and the total amounts of oxygen consumed correspond to three atoms in the case of *p*-cresol and two atoms in the case of homocatechol. On the contrary, the oxygen consumption is markedly depressed with aniline at pH 7.0-9.0. Consequently the addition of aniline is followed by the shift of optimum pH for the oxygen uptake from an alkaline to an acid side.

The present paper is a continuation of Sasaki's investigation and reports on the action of potatoe tyrosinase on trihydric phenols, such as hydroxyquinol (1,2,4-trihydroxybenzene), phloroglucinol (1,3,5-trihydroxybenzene) and pyrogallol (1,2,3-trihydroxybenzene). Jackson (1939) has already shown that the amount of oxygen required for the enzymic oxidation of hydroxyquinol is one atom, whereas in the presence of aniline two atoms of oxygen are absorbed. His experiment was however carried out at pH 5.9 alone. Inasmuch as the oxygen uptake of the tyrosinase system is, as Sasaki pointed out, greatly influenced both by the pH of the medium and by the amount of aniline added, the author examined the action of tyrosinase on the three trihydric phenols by changing the pH of the reaction mixture as well as in the presence of varying

amounts of aniline.

EXPERIMENTAL METHODS.

Enzyme: Tyrosinase was prepared from potatoe according to the method described by Kawasaki (1938). Only the "alumina preparation" was employed throughout this work.

Substances: Hydroxyquinol. *p*-quinone was first prepared from aniline by the method of Erdmann: M.P. 116°C. 1,2,4-trihydroxybenzene was then prepared from *p*-quinone obtained by the procedure described by Jackson (1939). The product, recrystallized from ether, melted at 140.5°C.

Phloroglucinol and pyrogallol were Merck products. The former contained two molecules of crystallization water.

Measurement of oxygen uptake: Oxygen uptake was determined by the use of Warburg's apparatus in exactly the same manner as reported by Sasaki (1940, b). 0.5 cc. of the tyrosinase solution, 3.0 cc. of phosphate buffer solution and 1.5 cc. of distilled water (or an aniline solution of a varying concentration) were introduced into the main compartment of the manometer vessel and 0.5 cc. of 5.0 per cent KOH solution into the central compartment, while 0.5 cc. of the *M*/300 substrate solution were placed in the side chamber. The vessel was then filled with oxygen and the apparatus was shaken in a thermostat at 25°C. After temperature equilibrium was reached, the substrate solution was added to the reaction fluid. The readings were then taken at intervals of 10 minutes. In order to determine the oxygen uptake due to the autoxidation of trihydric phenols, alone or in the presence of aniline, experiments were also carried out using distilled water in place of tyrosinase solution.

EXPERIMENTAL RESULTS.

I. Experiments with hydroxyquinol.

We examined at first the action of tyrosinase on hydroxyquinol by changing the pH of the reaction mixture from 4.0 to 10.0. The results are shown in Fig. 1.

Fig. 1.

The enzymic and autoxidation of hydroxyquinol at varying pH.
Temp. = 25°C.

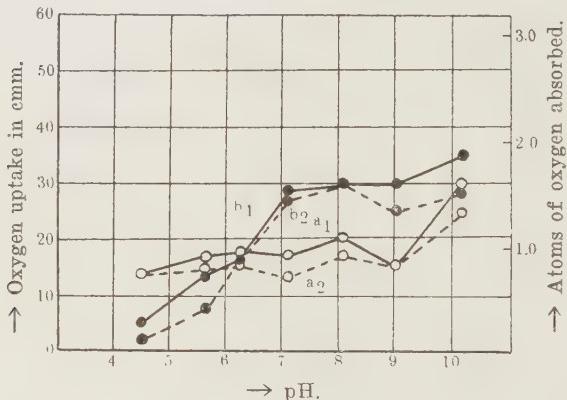
Oxygen uptake after 60 (curves a_2 and b_2) and
120 (curves a_1 and b_1) minutes.

a. Enzymic oxidation of hydroxyquinol (curves a_1 and a_2).

0.5 cc. tyrosinase
 $\left. \begin{array}{l} 3.0 \text{ cc. } M/10 \text{ phosphate buffer} \\ 1.5 \text{ cc. distilled water} \end{array} \right\} + 0.5 \text{ cc. } M/300 \text{ hydroxyquinol}$

b. Autoxidation of hydroxyquinol (curves b_1 and b_2).

0.5 cc. distilled water
 $\left. \begin{array}{l} 3.0 \text{ cc. } M/10 \text{ phosphate buffer} \\ 1.5 \text{ cc. distilled water} \end{array} \right\} + 0.5 \text{ cc. } M/300 \text{ hydroxyquinol}$



Curves in Fig. 1 represent the amounts of oxygen absorbed after 60 (dotted lines) and 120 minutes respectively. As the absorption of 18.63 cmm. oxygen (0°C. 760 mmHg) corresponds to one atom of oxygen per molecule of substrate, one atom of oxygen is taken up at pH 5.0–7.0 after 120 minutes (cf. curve a_1). At pH 8.0, however, slightly more than one atom of oxygen is consumed. Curves b_1 and b_2 in the figure give the oxygen consumption caused by the autoxidation of the substrate.

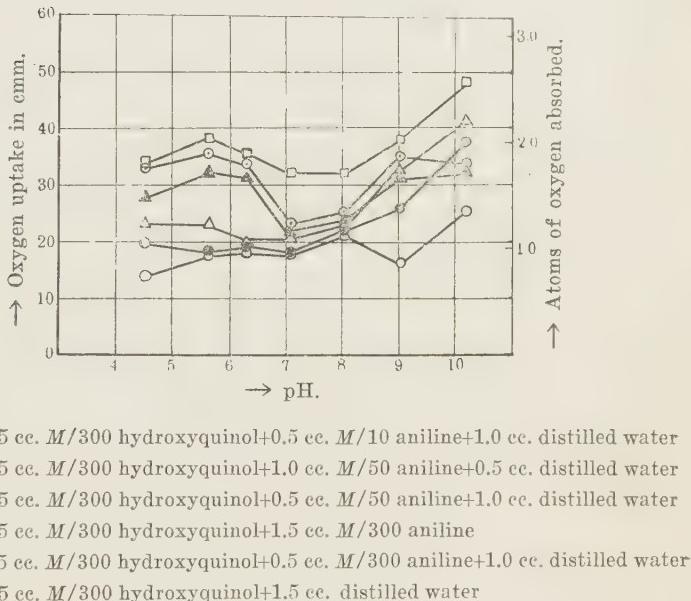
Experiments were then performed with the addition of an increasing amount of aniline. In Fig. 2 are recorded the curves showing the oxygen uptake after 120 minutes in the presence of varying amounts of aniline.

Fig. 2.

Action of tyrosinase on hydroxyquinol in the presence of aniline at varying pH. Temp. = 25°C.

Oxygen uptake after 120 minutes.

0.5 cc. tyrosinase
3.0 cc. M/10 phosphate buffer
1.5 cc. (aniline solution + distilled water)
+ 0.5 cc. M/300 hydroxyquinol



It will be seen from Fig. 2, that in the presence of an increasing amount of aniline the oxygen absorption at pH 5.0–6.0 gradually rises and finally, on adding more than 6 mols per molecule of substrate, it reaches two atoms, while at pH 7.0–8.0 no marked change in the oxygen uptake is brought about by aniline.

Jackson (1939) oxidized hydroxyquinol by means of tyrosinase with the addition of aniline at pH 5.9 and obtained 5-anilino-4-hydroxy-1,2-quinone as an oxidation product. As the oxygen uptake of the tyrosinase system in the presence of aniline is markedly influenced by pH of reaction mixtures, an attempt

was made to compare the amounts of hydroxymonoanilinoquinone produced at pH 4.51, 5.59 and 7.06 respectively.

2 g hydroxyquinol and 4.5 g aniline (3 mols per molecule of hydroxyquinol) were taken in a litre flask and dissolved in 50 cc. *M/10* phosphate buffer (pH 4.51, 5.59 and 7.06) with the addition of 450 cc. distilled water. 40 cc. tyrosinase solution were then added and the fluid was gently aerated with the air which was led through a wash-flask containing water and chloroform. A violet-black precipitate, which separated out in the solution, was filtered off after the lapse of 24, 48 and 72 hours respectively. The filtrate was then repeatedly extracted with ether, until no coloured substance was left in the solution. On evaporating the ethereal solution a black resin remained. The coloured products thus obtained were dried in vacuo, weighed and its nitrogen contents were determined. Table I shows the results obtained.

It will be seen from Table I that all the precipitates show nitrogen contents, which nearly correspond to that of hydroxymonoanilinoquinone. This fact indicates that no dianilino-*o*-quinone is produced in the oxidation products. The maximum quantity of monoanilino compound was formed in the case of oxidation of pH 5.59. The precipitate obtained in this case was recrystallized from acetone. The crystalline product thus obtained

TABLE I.
Oxidation products of hydroxyquinol (2 g) by the action of tyrosinase
in the presence of aniline (4.5 g).

a. Oxidation at pH 4.51.

	Precipitate after 24 hours aeration	Precipitate after 48 hours aeration	Precipitate after 72 hours aeration	Total	Ether extract of the filtrate
Weight (g)	0.044	0.135	0.425	0.604	1.475
Nitrogen content (%)	5.38	5.17	6.03		5.85
Remarks	Violet-black powder	Violet-black powder	Violet-black powder		Black resin

b. Oxidation at pH 5.59.

	Precipitate after 24 hours aeration	Precipitate after 48 hours aeration	Precipitate after 72 hours aeration	Total	Ether extract of the filtrate
Weight (g)	0.740	0.390	0.110	1.240	2.230
Nitrogen content (%)	6.60	6.52	6.92		8.23
Remarks	Violet-black powder Recrystallization from acetone: M.P. above 213° N, 6.21%	Violet-black powder	Violet-black powder		Black resin

c. Oxidation at pH 7.06.

	Precipitate after 24 hours aeration	Precipitate after 48 hours aeration	Precipitate after 72 hours aeration	Total	Ether extract of the filtrate
Weight (g)	0.002	0	0	0.002	3.14
Nitrogen content (%)					9.17
Remarks	Violet-black powder				Black resin

decomposed approximately above 213°C, and gave, N, 6.21% (calculated for $C_{12}H_9O_3N$, N, 6.53%). In the case of oxidation at pH 4.51 the precipitate of anilino compound markedly decreased, while oxidation at pH 7.06 gave only a trace of it.

II. Experiments with pyrogallol.

In Fig. 3 is shown the enzymic and autoxidation of pyrogallol at varying pH.

It was found by Pugh and Raper (1927) that the oxidation of pyrogallol by tyrosinase is accompanied by the absorption of

Fig. 3.

The enzymic and autoxidation of pyrogallol at varying pH.

Temp. = 25°C.

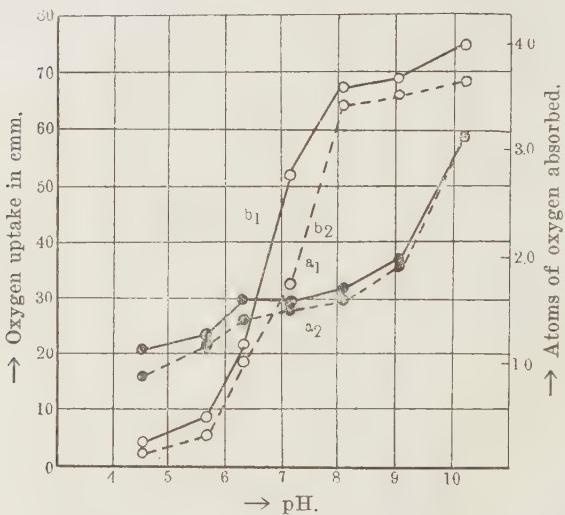
Oxygen uptake after 60 (curves a_2 and b_2) and
120 (curves a_1 and b_1) minutes.

- a. Enzymic oxydation of pyrogallol (curves a_1 and a_2).

0.5 cc. tyrosinase
 $\left. \begin{array}{l} 3.0 \text{ cc. } M/10 \text{ phosphate buffer} \\ 1.5 \text{ cc. distilled water} \end{array} \right\} + 0.5 \text{ cc. } M/300 \text{ pyrogallol}$

- b. Autoxidation of pyrogallol (curves b_1 and b_2).

0.5 cc. distilled water
 $\left. \begin{array}{l} 3.0 \text{ cc. } M/10 \text{ phosphate buffer} \\ 1.5 \text{ cc. distilled water} \end{array} \right\} + 0.5 \text{ cc. } M/300 \text{ pyrogallol}$



1.5 atoms of oxygen. The absorption of three atoms of oxygen per two molecules of pyrogallol corresponds to the formation of purpurogallin. Fig. 3 shows us that this amount of oxygen is taken up at pH 6.0–7.0 after 60 minutes. As we shall see presently the amount of oxygen consumed remains constant at this stage for a certain length of time, with a subsequent slight increase on continued shaking (cf. the lowest curve in Fig. 6). At pH 4.5, however, one atom of oxygen is used up after 60 minutes and this amount also remains constant for some time (cf. the lowest curve in

Fig. 5). Curves b₁ and b₂ in Fig. 3 show the oxygen uptake due to autoxidation of pyrogallol at a different pH.

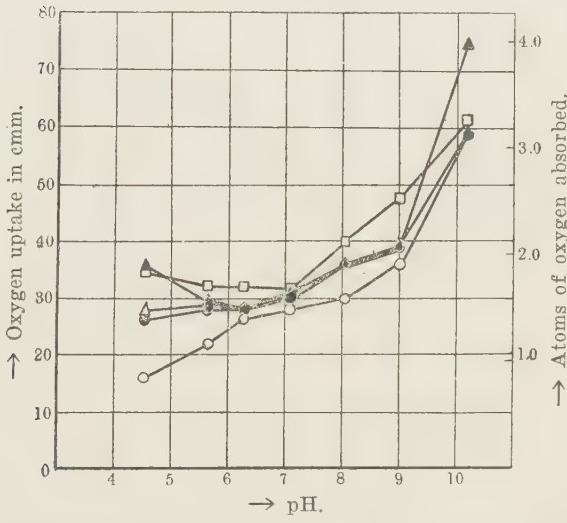
The experiments were then carried out with the addition of increasing amounts of aniline. Fig. 4 shows the oxygen consumption after 60 minutes.

Fig. 4.

Action of tyrosinase on pyrogallol in the presence of aniline at varying pH. Temp.=25°C.

Oxygen uptake after 60 minutes.

0.5 cc. tyrosinase
 3.0 cc. M/10 phosphate buffer
 1.5 cc. (aniline solution + distilled water) }
 + 0.5 cc. M/300 pyrogallol



- 0.5 cc. M/300 pyrogallol+1.0 cc. M/10 aniline+0.5 cc. distilled water
- ▲—▲ 0.5 cc. M/300 pyrogallol+0.5 cc. M/50 aniline+1.0 cc. distilled water
- △—△ 0.5 cc. M/300 pyrogallol+1.5 cc. M/300 aniline
- 0.5 cc. M/300 pyrogallol+0.5 cc. M/300 aniline+1.00 cc. distilled water
- 0.5 cc. M/300 pyrogallol+1.5 cc. distilled water

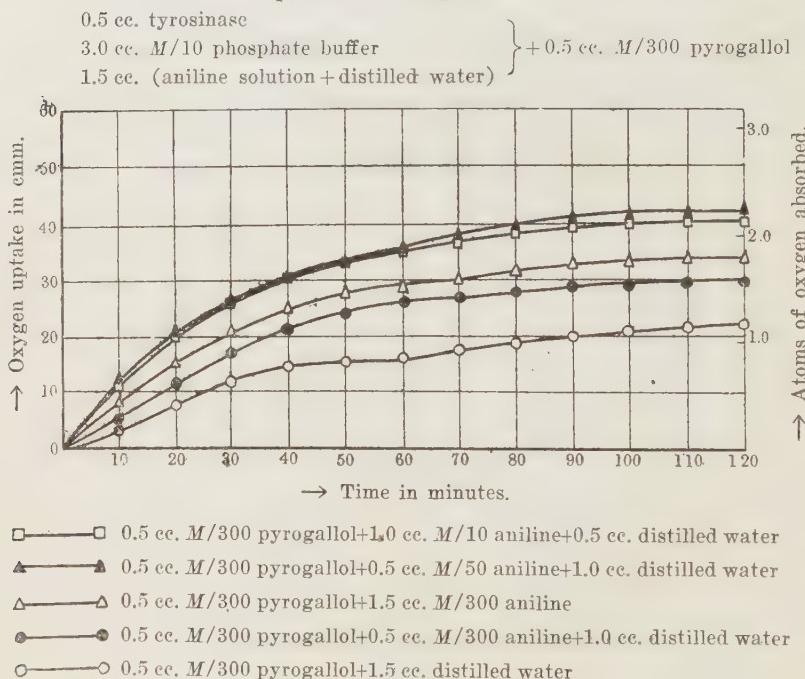
It is clear from Fig. 4, that at pH 4.5 the oxygen uptake gradually increases with the amount of aniline added and finally, in the presence of more than 6 mols aniline per molecule of pyrogallol, it reaches two atoms. At pH 6.0–7.0, however, scarcely

any increase in the oxygen uptake is noted upon addition of aniline. Figs. 5 and 6 illustrate the action of tyrosinase on pyrogallol in the presence of a different amount of aniline at pH 4.51 and 7.06 respectively.

Fig. 5.

Action of tyrosinase on pyrogallol in the presence of aniline.

pH = 4.51. Temp. = 25°C.



The oxidation product of pyrogallol in the presence of aniline was then examined in exactly the same manner as in the case of hydroxyquinol. The results are recorded in Table II.

A brownish yellow precipitate was produced, which contained 7.03–7.57 per cent nitrogen. This indicates that aniline reacts with an oxidation product of pyrogallol to form an anilino compound. The yields of the substance did not vary much with the pH of a reaction mixture. The chemical nature of this product awaits further examination.

Fig. 6.

Action of tyrosinase on pyrogallol in the presence of aniline.
pH = 7.06. Temp. = 25°C.

0.5 cc. tyrosinase
3.0 cc. M/10 phosphate buffer } + 0.5 cc. M/300 pyrogallol
1.5 cc. (aniline solution + distilled water)

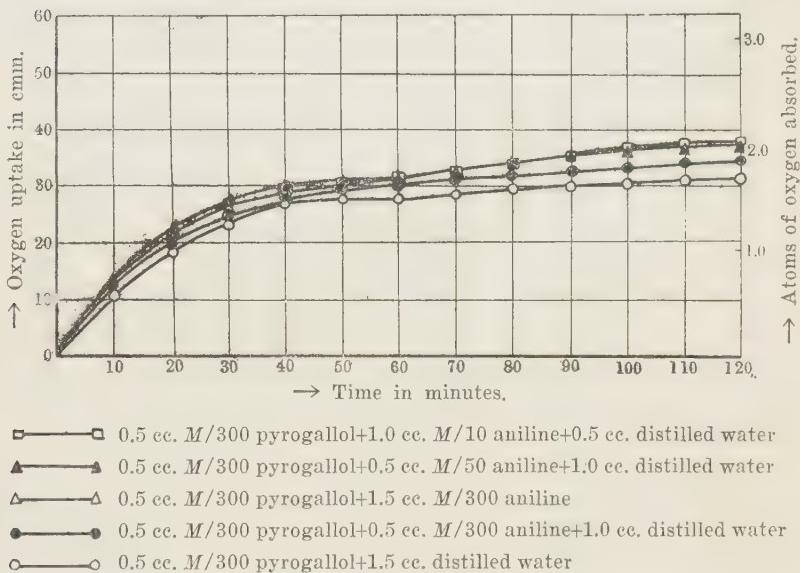


TABLE II.
Oxidation products of pyrogallol (2 g) by the action of tyrosinase
in the presence of aniline (4.5 g).

a. Oxidation at pH 4.51.

	Precipitate after 24 hours aeration	Precipitate after 48 hours aeration	Precipitate after 72 hours aeration	Total	Ether extract of the filtrate
Weight (g)	0.352	0.104	0	0.456	2.047
Nitrogen content (%)	7.20	7.57			3.57
Remarks	Brownish yellow powder	Brownish yellow powder			Brown resin

b. Oxidation at pH 5.59.

	Precipitate after 24 hours aeration	Precipitate after 48 hours aeration	Precipitate after 72 hours aeration	Total	Ether extract of the filtrate
Weight (g)	0.552	0	0	0.552	1.468
Nitrogen content (%)	7.03				2.68
Remarks	Brownish yellow powder				Brown resin

e. Oxidation at pH 7.06.

	Precipitate after 24 hours aeration	Precipitate after 48 hours aeration	Precipitate after 72 hours aeration	Total	Ether extract of the filtrate
Weight (g)	0.559	0	0	0.559	1.141
Nitrogen content (%)	7.06				2.57
Remarks	Brownish yellow powder				Brown resin

III. Experiments with phloroglucinol.

Fig. 7 shows the action of tyrosinase on phloroglucinol at different pH.

Fig. 7 tells us that with phloroglucinol a considerably larger amount of oxygen is consumed than with other trihydric phenols. At pH 7.0 more than 4 atoms of oxygen are absorbed after 240 minutes. Moreover, phloroglucinol undergoes no spontaneous oxidation even in a strongly alkaline reaction. Fig. 8 shows the effect of the addition of an increasing amount of aniline.

It will be seen from Fig. 8, that in the case of phloroglucinol the oxygen uptake is markedly depressed even with a minute amount of aniline. With three mols aniline per molecule of phloroglucinol, the oxygen consumption is reduced to a definite extent

Fig. 7.

The enzymic and autoxidation of phloroglucinol at varying pH.

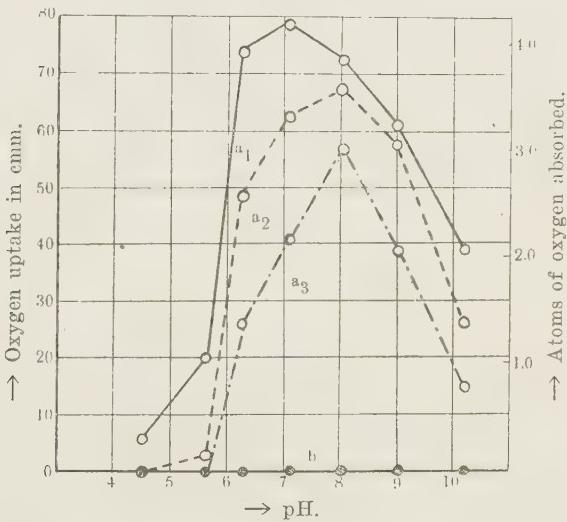
Temp. — 25°C.

Oxygen uptake after 60 (curve a_3), 120 (curve a_2) and 240 (curve a_1) minutes.

- a. Enzymic oxidation of phloroglucinol (curves a_1 , a_2 and a_3)

0.5 cc. tyrosinase	}	+ 0.5 cc. M/300 phloroglucinol
3.0 cc. M/10 phosphate buffer		
1.5 cc. distilled water		
- b. Autoxidation of phloroglucinol (curve b)

0.5 cc. distilled water	}	+ 0.5 cc. M/300 phloroglucinol
3.0 cc. M/10 phosphate buffer		
1.5 cc. distilled water		

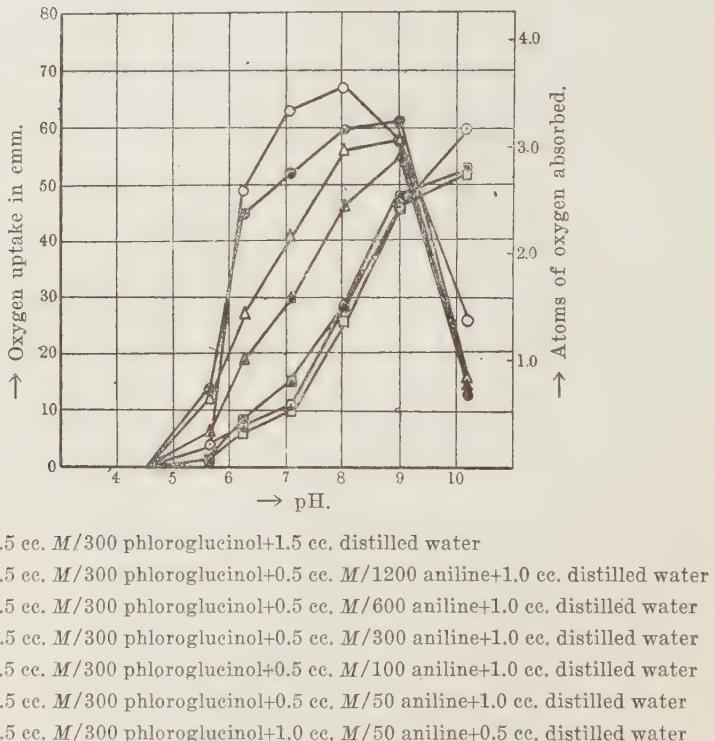


and on increasing the amount of aniline no more depression takes place. At pH 5.0–6.0, where the oxygen uptake is very small, a certain increase is brought about by small amounts of aniline, while with a larger amount, however, a depression being noticeable. The isolation of oxidation product was attempted in the same way as in the case of hydroxyquinol and pyrogallol. Quite in accordance with the fact that aniline retards the oxidation of phloroglucinol, it was found that no such anilino compound was found as in the case of other trihydric phenols.

Fig. 8.

Action of tyrosinase on phloroglucinol in the presence of aniline
at varying pH. Temp. = 25°C.
Oxygen uptake after 120 minutes.

0.5 cc. tyrosinase
3.0 cc. M/10 phosphate buffer
1.5 cc. (aniline solution + distilled water)
+ 0.5 cc. M/300 phloroglucinol



DISCUSSION.

According to Sasaki (1940, b) the enzymic oxidation of *p*-cresol and homocatechol at pH 4.0–5.0 is accompanied by the absorption of two and one atoms of oxygen respectively. These amounts of oxygen correspond to those just necessary for the formation of *o*-quinones from these phenols. The addition of aniline to these tyrosinase systems brings about the absorption of another

atom of oxygen in the formation of anilino compounds of *o*-quinones. At pH 7.0–9.0, however, where the oxidation of *p*-cresol and homocatechol alone requires three and two atoms of oxygen respectively, i.e. one atom more of oxygen than that corresponding to the formation of *o*-quinones, aniline causes a marked depression of the oxygen uptake. The yield of anilino compounds at this pH was distinctly less than that at the acid reaction. Our experiments with hydroxyquinol and pyrogallol show similarly, that at an acid reaction one atom of oxygen is consumed without aniline, thus corresponding to the formation of *o*-quinones from these trihydric phenols, and that the presence of aniline brings about the absorption of an additional atom of oxygen. At a neutral or an alkaline reaction, however, where slightly or fairly more than one atom of oxygen is consumed, no marked change in the oxygen uptake is brought about upon addition of aniline. The only product, which makes its appearance as an oxidation product of hydroxyquinol was hydroxymonoanilinoquinone, and no formation of dianilino-*o*-quinone was observed.

The results of these experiments performed by the use of different kinds of phenols led to the conclusion, that in the case of oxidation of phenols by the action of tyrosinase *o*-quinones appear as intermediary products, and that *o*-quinones thus produced then react with aniline to form corresponding anilino compounds. It can by no means be admitted, as it has been suggested by Wagreich and Nelson (1936), that, in the case of enzymic oxidation of monohydric as well as dihydric phenols, the *o*-quinones produced at first undergo further oxidation to hydroxy-*o*-quinones, and that the latters then react with aniline under the formation of anilino compounds.

SUMMARY.

The action of potatoe tyrosinase on hydroxyquinol, phloroglucinol and pyrogallol was examined by changing the pH of the medium as well as in the presence of varying amounts of aniline.

1. In the case of enzymic oxidation of hydroxyquinol, one atom of oxygen is absorbed at pH 5.0–7.0, while slightly more than

one atom is consumed at pH 8.0. In the presence of aniline the oxygen uptake increases to two atoms at an acid reaction, whereas no marked change in the oxygen uptake occurs at a neutral or an alkaline reaction. The maximum amount of hydroxyanilino-*o*-quinone is produced in the case of oxidation at pH 5.59.

2. The enzymic oxidatioin of pyrogallol requires 1.5 atoms oxygen at pH 6.0-7.0 and only one atom at pH 4.5. These amounts of oxygen absorbed remain constant at these stages for a certain length of time. Upon addition of aniline the oxygen uptake is increased to two atoms at an acid reaction, whereas no noticeable increase is brought about at a neutral reaction.

3. In the case of oxidation of phloroglucinol, a fairly large amount of oxygen was consumed than in the case of other trihydric phenols. The presence of aniline markedly depresses the oxygen uptake. At pH 5.0-6.0, however, where the oxygen uptake is very small, a certain increase is noted with the addition of a minute amount of aniline.

4. It was concluded that hydroxy-*o*-quinones can not be accepted as intermediary products of the enzymic oxidation of monohydric as well as dihydric phenols.

In conclusion the author wishes to express his sincere thanks to Prof. Dr. T. Uchino for his kind direction throughout this investigation.

The expence of this research was defrayed by a grant from the Hattori Hokokai Foundation.

REFERENCES.

- Erdmann (1923): Vanino's "Präparative Chemie", zweite Auflage, **2**, 683.
Jackson (1939): Biochem. J., **33**, 1452.
Kawasaki (1938): J. of Biochem., **28**, 383.
Pugh and Raper (1927): Biochem. J., **21**, 1370.
Robinson and McCance (1925): Biochem. J., **19**, 251.
Sasaki (1940, a): J. of Biochem., **32**, 211.
Sasaki (1940, b): J. of Biochem., **32**, 225.
Wagreich and Nelson (1936): J. Biol. Chem., **115**, 459.

STUDIEN ÜBER POLYSACCHARIDE AUS PATHOGENEN PILZEN.

III. Mitteilung.

VON

FUZIO FUKÉ.

(Aus der Dermatologischen Abteilung (Prof. H. Yanagihara)
und der Biochemischen Abteilung (Leiter Dr. K. Makino),
Dairen Hospital, Südmandschurei.)

(Eingegangen am 18. November 1941)

In den früheren Mitteilungen habe ich schon nachgewiesen, dass die Polysaccharide aus Achorion gypseum, Trichophyton violaceum und Microsporon lanosum biologisch stark wirksam waren.

Aber aus den Ergebnissen der chemischen und immunbiologischen Untersuchungen liess sich kaum ein Unterschied zwischen den Polysacchariden dieser drei Arten erkennen.

In der vorliegenden Abhandlung habe ich das Polysaccharid aus Epidermophyton inguinale untersucht. Dieser Stamm wurde von der Dermatologischen Abteilung der Mandschurischen Medizinischen Hochschule zu Mukden geschenkt.

[SOLIERUNG DES POLYSACCHARIDS.]

Aus den üppig gewachsenen Kulturen von Epidermophyton inguinale wurde das Polysaccharid in derselben Weise mit Alkohol und Eisessig ausgefällt und gereinigt, wie in den früheren Mitteilungen erwähnt.

Das Polysaccharid war eine weissliche, amorphe und hygroskopische Substanz.

CHEMISCHE ANALYSE DES POLYSACCHARIDS.

Mit Jod-Jodkali-Lösung gibt das Polysaccharid eine rotbraune Färbung, ähnlich der Glykogen-Jodreaktion. Übliche Proteinreaktion wie Biuret, Xanthoprotein und Millon fielen negativ aus.

α -Naphtholreaktion nach Molisch war positiv. Orzinreaktion nach Bial fiel nur nach längerer Erhitzung schwach positiv aus. Es war durch Uronsäure erzeugt worden.

Naphthoresorzinreaktion nach Tollenis-Neuberg, war positiv, der dabei entstehende Farbstoff war in Benzol mit rotvioletter Farbe löslich. Azetonreaktion nach Rosenthaler und Resorzinreaktion nach Seliwanoff-Weehuizen fielen negativ aus.

Reduzierender Zucker als Glukose betrug 60% (Hagedorn-Jensen).

Bestimmung des Drehungsvermögens.

0,1 g Subst. 10 ccm Wasser L=1 dm

$\alpha = +0,8^\circ$ $[\alpha]_D = +80^\circ$

Mikroelementaranalysen des Polysaccharids.

2,905 mg Subst.; 3,900 mg CO₂ 1,490 mg H₂O

Gef. C=36,61%

H= 5,74%

10,580 mg Subst.; 0,059 cc N₂ (17°, 770 mm)

N=0,66%

HYDROLYSE DES POLYSACCHARIDS.

2 g des Trockenpulvers von Epidermophyton inguinale wurden mit 50 ccm 1 n-Schwefelsäure unter Rückflusskühler auf dem Wasserbad 6 Stunden erhitzt.

Nach dem Filtrieren wurde das Hydrolysat durch Baryt quantitativ von Schwefelsäure befreit und die filtrierte Lösung zu Sirup eingeengt. Damit wurden folgende Reaktionen angestellt; Jodreaktion, Resorzin-, Azeton-, und Orzinreaktion. Alle Reaktionen fielen negativ aus. Jedoch α -Naphthol- und Naphthoresorzinreaktion ergaben positive Reaktion und es reduzierte die Fehlingsche Lösung in der Wärme.

Der Sirup wurde in 20 fache Menge Methylalkohol eingegossen und gut geschüttelt, der entstehende Niederschlag wurde dann abzentrifugiert, mit Äther gewaschen und getrocknet. 0,073 g Bariumsalz der Uronsäure wurde erhalten.

Die Mutterlauge des Hydrolysats wurde stark konzentriert

und nach dem Verjagen des Methylalkohols in 10 ccm Wasser gelöst. Die Lösung wurde zum Sirup eingeengt und mit Alkohol extrahiert, nach dem Eindampfen der alkoholischen Lösung wieder in 5 ccm Wasser gelöst. Damit wurden nochmals folgende Reaktionen ausgeführt: Naphthoresorzin- und Orzinreaktion. Die Reaktionen fielen negativ aus. Darüber wurden 0,2 g Phenylhydrazinhydrochlorid und 0,3 g Natrium Azetat zugesetzt. Aus der Lösung schieden nach 24 Stunden im Eisschrank nur einige braune Krystalle aus, die nach Filtrieren und Trocken einen Schmelzpunkt von 191° und mit reinem Mannosephenylhydrazon einen Mischschmelzpunkt von 193° aufwiesen. Das Filtrat erhielt nunmehr einen Zusatz von 0,2 g Phenylhydrazinhydrochlorid und Natrium Azetat und wurde zur Gewinnung des Osazons auf dem Wasserbad eine Stunde erwärmt. Aus der Lösung schied sich über Nacht eine mässige Menge Glukoseosazon ab. Nach zweimaligen Umkristallisationen aus 60%igem Alkohol schmolz das Osazon bei 204,5° und zeigte keine Depression des Schmelzpunktes bei der Mischprobe mit reinem Glukosephenylosazon.

Die Uronsäure wurde mit verdünnter Schwefelsäure aus dem Bariumsalz in Freiheit gesetzt und nach dem Filtrieren konzentriert. Es gab eine stark positive Naphthoresorzinreaktion. Der dabei entstehende Farbstoff war in Benzol mit rotvioletter Farbe löslich und zeigte ein Spektraladsorptionsband auf D (Natrium). Die konzentrierte Lösung wurde mit 30 ccm Salpetersäure (spez. Gew. 1,15) oxydiert, jedoch keine Schleimsäure nachgewiesen. Aus den oben erwähnten Ergebnissen lässt sich vermuten, dass es Glucuronsäure sei.

IMMUNBIOLOGISCHE VERSUCHE.

Zwei Kaninchen erhielten Injektionen des Pilzzellpulvers von *Epidermophyton inguinale*. Das trockene Pilzzellpulver von *Epidermophyton inguinale* wurde mit 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und Kaninchen intraperitoneal eingespritzt. Diese Einspritzungen wurden während zwei Wochen dreimal wiederholt, und zwar war die Menge des Trockenpulvers erstmals 0,3 g zweitmals 0,6 g und drittmais 1,2 g.

4-5 Wochen nach der ersten Einspritzung wurde das Kaninchenblut entnommen und das inaktivierte Serum in der Komplementbindungsprobe mit dem Polysacchariden untersucht.

Das Ergebnis der Komplementbindungsprobe erwies sich als sehr interessant.

Serum	Antigen	1	2	4	8	16	32	64	128	256	Kontrolle
Ep.	Ep.	#	#	#	#	#	#	#	#	#	-
	M.l.	#	#	+	-	-	-	-	-	-	-
M.l.	Ep.	#	#	#	#	#	#	+	+	-	-
	M.l.	#	#	#	#	#	#	+	-	-	-

Ep. = *Epidermophyton inguinale*. M.l. = *Microsporon lanosum*.

1 = 1,000 2 = 2,000 4 = 4,000.....facher Verdünnung des Antigens.

Wie die oben gezeigte Abbildung beweist, ist ein typenspezifisches Verhalten gegenüber den Polysacchariden von *Microsporon lanosum* und *Epidermophyton inguinale* deutlich. Das mit *Epidermophyton inguinale* vorbehandelte Kaninchenserum ergibt eine positive Komplementbindung mit dem homologen Polysaccharid bis zu 256,000 facher Verdünnung, während die Reaktion mit dem Polysaccharid von *Microsporon lanosum* nur in 4,000 facher Verdünnung nachweisbar ist.

Verfass. hat schon nachgewiesen, dass die Polysaccharide von *Microsporon lanosum*, *Trichophyton violaceum* und *Achorion gypseum* untereinander kein typenspezifisches Verhalten haben und in der immunbiologischen Klassifikation der pathogenen Pilze zu derselben Anordnung gehören (Fuké). Daraus folgt, dass nur *Epidermophyton inguinale* immunbiologisch zu einer besonderen Anordnung gehören sollte.

LITERATUR.

Fuké: J. of Biochem., 34, 39 & 251.

STUDIEN ÜBER POLYSACCHARIDE AUS PATHOGENEN PILZEN.

IV. Mitteilung.

VON

FUZIO FUKÉ.

(*Aus der Dermatologischen Abteilung (Prof. H. Yanagihara) und
der Biochemischen Abteilung (Leiter: Dr. K. Makino),
Dairen Hospital Dairen, Südmandschurei.*)

(Eingegangen am 18. November 1941)

In den früheren drei Mitteilungen wurde über die Polysaccharide aus pathogenen Pilzen *Trichophyton violaceum*, *Achorion gypseum*, *Microsporon lanosum* und *Epidermophyton inguinale* berichtet und zu folgenden Ergebnissen gekommen; jedes Polysaccharid gibt spezifische Serum- und allergische Reaktion, d. h. es absorbiert die Ambozeptoren aus dem hochwertigen Immunserum, das durch das homologe Vollantigen erzeugt wird. Die Polysaccharide aus *Trichophyton violaceum*, *Microsporon lanosum* und *Achorion gypseum* geben beinahe gleiche Gruppenreaktion, während das Polysaccharid aus *Epidermophyton inguinale* ein typenspezifisches Verhalten gibt.

Wenn auch in der botanischen Klassifikation die pathogenen Pilze (Hyphomyceten) bisher in mehrere Dutzend Arten eingeteilt werden, so sind die klinischen Symptome, die durch diese Erreger hervorgerufen werden, doch voneinander kaum abweichend. Es scheint mir daher, dass man die pathogenen Pilze immunbiologisch nur in einige Gruppen einteilen kann.

In der vorliegenden Mitteilung soll zuerst die Isolierung des Polysaccharids aus *Trichophyton interdigitale* und dessen chemische und immunbiologische Untersuchung beschrieben werden. Dann werden an dieser Stelle die Polysaccharide der oben genannten fünf pathogenen Pilze in Bezug auf ihre chemischen und immunbiologischen Eigenschaften zueinander verglichen. Zum Schluss

soll noch die klinische Anwendung erwähnt werden.

ISOLIERUNG DES POLYSACCHARIDS.

Der Stamm von *Trichophyton interdigitale* wurde von der dermatologischen Abteilung der kaiserliche Universität zu Tokyo geschenkt. Aus den üppig gewachsenen Kulturen von *Trichophyton interdigitale* wurde das Polysaccharid nach der in den früheren Mitteilungen erwähnten Methode isoliert.

Das Polysaccharid stellte eine weissliche, amorphe und hygroskopische Substanz dar.

CHEMISCHE ANALYSE DES POLYSACCHARIDS.

Mit Jod-Jodkali-Lösung gibt das Polysaccharid eine der Glykogen-Jodreaktion ähnliche rotbraune Färbung. Übliche Eiweissreaktionen wie Biuret, Xanthoprotein und Millon fielen negativ aus. α -Naphtholreaktion nach Molisch war stark positiv, aber Orzinreaktion nach Bial und Naphthoresorzinreaktion nach Tollens-Neuberg fielen negativ aus. Azetonreaktion nach Rosenthaler und Resorzinreaktion nach Seliwanoff-Weehuizen waren auch negativ.

Reduzierender Zucker als Glukose betrug 86% (Hagedorn-Jansen).

Bestimmung des Drehungsvermögen;

$$0,2 \text{ gr Subst. } 10 \text{ ccm Wasser } L=1 \text{ dm} \\ a = +1,8^\circ \quad [\alpha]_D = +90^\circ$$

Mikroelementaranalyse des Polysaccharids

2,950 mg Subst. CO₂ 4,297 mg H₂O 1,857 mg

Gef; C = 39,56%, H = 7,04%.

3,430 mg Subst. N₂ = 0,020 cc (18° 769 mm)

N = 0,69%

HYDROLYSE DES POLYSACCHARIDS.

0,24 g Polysaccharid wurde mit 20 ccm 1*n* Schwefelsäure unter Rückflusskühler auf dem Wasserbad 5 Stunden erhitzt. Das Hydrolysat wurde dann durch Baryt quantitativ von Schwefelsäure befreit und die filtrierte Lösung zu Sirup eingeengt. Damit wurden

folgende Reaktionen angestellt; Jodreaktion, Resorzin-, Azeton-, und Orzinreaktion nach Bial. Alle Reaktionen fielen negativ aus. Es reduzierte die Fehlingsche Lösung in der Wärme. Naphthoresorzinreaktion nach Tollens-Neuberg war negativ.

Der Sirup wurde in 20 fache Menge Methylalkohol eingegossen und gut geschüttelt, aber kein Niederschlag wurde erhalten.

Die Mutterlauge des Hydrolysats wurde stark konzentriert und nach Verjagen des Methylalkohols in 10 ccm Wasser gelöst. Die Lösung wurde zu Sirup eingeengt und mit Alkohol extrahiert, nach Eindampfen der alkoholischen Lösung wieder in 5 ccm Wasser gelöst.

Dann wurden 0,3 g Phenylhydrazinhydrochlorid und 0,5 g Natrium azetat zugesetzt. Aus der Lösung schied nach 24 Stunden im Eisschrank eine mässige Menge Krystalle aus. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus 60%igem Alkohol zeigte der Krystall einen Schmelzpunkt von 194° und mit dem reinen *d*-Mannose Phenylhydrazon einen Mischschmelzpunkt von 195°.

Das Filtrat erhielt nunmehr einen Zusatz von 0,3 g Phenylhydrazinhydrochlorid und Natriumazetat und wurde zur Gewinnung des Osazons auf dem Wasserbad erwärmt.

Aus der Lösung schied sich über Nacht eine grosse Menge Glukoseosazon ab. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus 60%igem Alkohol schmolz das Osazon bei 204° und zeigte keine Depression des Schmelzpunktes bei der Mischprobe mit reinem Glukoseosazon.

Die Mutterlauge wurde mit Benzaldehyd von Phenylhydrazin befreit und zu 10 ccm konzentriert. Die Lösung wurde mit 30 ccm Salpetersäure (spez. Gew. 1,15) oxydiert, jedoch wurde keine Schleimsäure nachgewiesen.

IMMUNBIOLOGISCHE VERSUCHE.

Das trockene Pilzzellpulver von *Trichophyton interdigitale* wurde mit 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und Kaninchen intraperitoneal eingespritzt.

Diese Einspritzungen wurden während zwei Wochen dreimal wiederholt und zwar war die Menge des Trockenenpulvers erst-

mals 0,3 g, zweitenmals 0,6 g und drittenmals 0,9 g.

4-5 Wochen nach der ersten Einspritzung wurde das Kaninchenblut entnommen und das 5 fach verdünnte inaktivierte Serum in der Komplementbindungsprobe mit den Polysacchariden untersucht.

Das Ergebnis der Komplementbindungsprobe war folgendes:

TABELLE I.

Serum	Antigen	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	Kontrolle
T.i.	T.i.	#	#	#	#	#	#	+	±	-	-	-
	M.l.	#	#	#	#	#	#	+	±	-	-	-
	Ep.	#	#	#	#	+	#	#	+	-	-	-
M.l.	T.i.	#	#	#	#	+	±	-	-	-	-	-
	M.l.	#	#	#	#	#	+	±	-	-	-	-
	Ep.	#	#	#	#	+	+	+	-	-	-	-
Ep.	T.i.	#	#	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	M.l.	#	#	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ep.	#	#	#	#	#	#	#	#	#	#	-

T.i. = *Trichophyton interdigitale*.

M.l. = *Microsporon lanosum*.

Ep. = *Epidermophyton inguinale*.

1 = 1 000, 2 = 2 000, 4 = 4 000 . . . facher Verdünnung des Antigens.

Wie aus Tabelle I ersichtlich ist, erwies sich das Polysaccharid aus *Trichophyton interdigitale* im serologischen Verhalten nicht typenspezifisch, sondern gruppenspezifisch.

Das Polysaccharid von *Trichophyton interdigitale* reagiert nicht nur mit einem Serum, das durch Einspritzung mit den homologen Pilzzellen hergestellt wurde, sondern auch mit einem immunisierten Serum von *Microsporon lanosum* gleichwertig.

Daraus folgt, dass in der immunbiologischen Klassifikation der pathogenen Pilze *Trichophyton interdigitale* und *Microsporon lanosum* zu derselben Anordnung gehören müssen.

Die Ergebnisse der Komplementbindungsprobe mit diesen fünf Stämmen wurden tabellarisch niedergelegt.

TABELLE II.

Serum	Antigen	1	2	4	8	16	32	64	128	256	Kontrolle
T.v.	T.v.	#	#	#	+	±	—	—	—	—	—
	M.l.	#	#	#	#	+	+	±	—	—	—
	A.g.	#	#	#	#	+	+	+	±	—	—
A.g.	T.v.	#	#	#	+	±	—	—	—	—	—
	M.l.	#	#	#	#	#	#	+	—	—	—
	A.g.	#	#	#	#	#	#	+	—	—	—
M.l.	T.v.	#	#	#	+	+	±	±	—	—	—
	M.l.	#	#	#	#	#	+	±	—	—	—
	A.g.	#	#	#	#	#	#	+	—	—	—
	Ep.	#	#	#	#	#	+	+	—	—	—
	T.i.	#	#	#	#	+	+	±	—	—	—
Ep.	T.i.	#	#	+	—	—	—	—	—	—	—
	M.l.	#	#	+	—	—	—	—	—	—	—
	Ep.	#	#	#	#	#	#	#	#	#	—
T.i.	T.i.	#	#	#	#	#	#	+	—	—	—
	M.l.	#	#	#	#	#	#	+	—	—	—
	Ep.	#	#	#	#	#	#	+	—	—	—

Die mit diesen Polysacchariden geprüfte allergische Hautreaktion löste sich gleichmässig aus und zwischen denselben wurde kein typenspezifisches Verhalten nachgewiesen.

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die vier geprüften Hyphomycetenmikrobine, mit Ausnahme von *Epidermophyton inguinale*, ein gemeinsames Antigen enthalten. Das steht in guter Übereinstimmung mit der klinischen Erfahrung, dass die Infektion mit einem Stamm der Gruppen der Hyphomyceten, wenn sie zur Umstimmung führt, die Haut in der Regel auch für die anderen Hyphomycetenarten umstimmt. Das gemeinsame Antigen ist ein Faktor, der auch zur Erklärung der Tatsache mit herangezogen werden kann, dass durch die verschiedenen Hyphomyceten klinisch identische oder fast identische Bilder hervorgerufen werden können.

W. Jadassohn, F. Schaaf und W. Laetsch haben schon über die antigenanalytische Untersuchungen an Trichophytinen mit

Hilfe von der Schultz-Daleschen Versuchsanordnung mitgeteilt. Sie haben ihr Ergebnis in der folgenden Formel gezeigt.

Achorion quinckeum-----	+ + +
Trichophyton gypseum-----	
Epidermophyton Kaufmann-Wolf-----	
Achorion schonleini-----	

Wie aus Tabelle II ersichtlich, zeigte das Polysaccharid aus *Epidermophyton inguinale* ein typenspezifisches Verhalten. Daher möge das Ergebnis dieser Untersuchungen wie folgt formiert werden:

Trichophyton violaceum -----	+ + +
Microsporon lanosum-----	
Achorion gypsetum-----	
Trichophyton interdigitale-----	
Epidermophyton inguinale-----	

Nach der klinischen Erfahrung ist die Aufstellung einer systematischen Antigenformel der verschiedenen pathogenen Pilze nicht nur für wissenschaftliche Zwecke notwendig, sondern auch für die Kliniker wichtiger als die zur Zeit gebräuchliche botanische Einteilung.

Daher scheint die weitere Untersuchung der pathogenen Pilze in dieser Richtung unentbehrlich um gegenüber der bisherigen botanischen Klassifikation ein besonderes Schema formulieren zu können.

KLINISCHE ANWENDUNG DER POLYSACCHARIDE.

Die Polysaccharidlösung (1:1 000) löste eine gattungsspezifische Cutanreaktion beim an Trichophytia erkrankten Menschen aus. Daher kann das Polysaccharid für diagnostische Zwecke verwendet werden.

Ferner wichtig ist die therapeutische Anwendung. Verfasser hat die Polysaccharide zur Behandlung von Kerion celsi, Sykosis parasitaria und Pompholyx verwendet.

Die Behandlung wird in folgender Weise durchgeführt. 0,1 oder 0,2 ccm der 0,2% igen Polysaccharidlösung wird am Oberarmen dem Patienten intrakutan injiziert. Der positive Ausfall der Reaktion zeigte sich nach 24–48 Stunden in einer örtlichen an der Applikationsstelle lokalisierten Entzündung. Im wesentlichen entsprechen die Reaktionserscheinungen durchaus denjenigen, die bei der Tuberkulose nach Tuberkulininjektionen beobachtet werden.

Die Einspritzungen werden jeden zweiten Tag solange wiederholt, bis keine Reaktion mehr auftritt.

Bei Kerion und Sýkosis hat diese Behandlung einen ganz ausgezeichneten Erfolg gezeigt. Bei Pompholyx wurde ein mässiger Erfolg erzielt. Vor allem bei den ekzematösen nässenden oder chronischen rhagadischen Krankheitsbildern wurden die subjektiven Beschwerden auffallend erleichtert.

Bei Herpes tonsurans capilliti und Trichophytia superficialis wurde kein deutlicher Erfolg gesehen.

Die Behandlung löste fast keine Nebenerscheinung aus. Nur in einem einzigen Falle wurde eine auffallende, interessante Nebenerscheinung beobachtet. Bei einem 48 jährigen Mann, der mehrere Jahre hindurch an Fussmykose litt, zeigten sich nach Injektion des Polysaccharids die Krankheitsbilder von Dermatitis herpetiformis Düring. Die Komplementbindungsprobe mit dem Polysaccharid ergab sich als positiv und 17%ige Eosinophilie wurde am Blutbilde nachgewiesen.

Abgesehen davon kann die Behandlung der Trichophytie mit Pilzpolysacchariden empfohlen werden.

SCHLUSSFOLGERUNG.

Aus der Gesamtheit der bisherigen Untersuchungen über die biochemischen und immunbiologischen Studien der pathogenen Pilze können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden.

1. Die aus pathogenen Pilzen isolierten Polysaccharide stellten sich amorphe hygroskopische Substanzen dar. Übliche Proteinreaktionen ergaben sich als negativ, während die Kohlenhydratreaktion nach Molisch positiv ausfällt.
2. Die Elementaranalyse beweist das Vorhandensein von C, H

und O in Mengen, die der allgemeinen Polysaccharidformel entsprechen. Daneben werden geringe Mengen von Stickstoff nachgewiesen.

3. Erst nach Säurehydrolyse zerfallen sie in ihren Bausteine, die eine starke Reduktionswirkung ausüben. Als Hydrolysenprodukte der Polysaccharide werden *d*-Glukose, *d*-Mannose und Glukuronsäure nachgewiesen.

4. Die gereinigten Polysaccharide geben spezifische Seren (Komplementbindungsprobe) und allergische Reaktion. Es glückte mir also zum erstenmal in den Tierversuchen der Trichophytia einen humoralen Antikörper *in vitro* einwandfrei nachzuweisen.

5. Die Spezifität der Reaktion ist nicht artspezifisch, sondern gattungsspezifisch. Aber das Polysaccharid aus *Epidermophyton inguinale* erwies sich als typenspezifisch. Daher scheint nur *Epidermophyton inguinale* immunbiologisch zu einer besonderen Anordnung zu gehören.

6. Die Behandlung der Trichophytia mit diesen Polysacchariden haben einen guten Erfolg hervorgebracht und ist daher empfehlenswert.

(Vorstehende Arbeit wurde mit Unterstützung von Prof. H. Yanagihara, Dr. K. Makino und I. Watanabe durchgeführt, wofür an dieser Stelle bestens gedankt sei.)

LITERATUR.

W. Jadassohn, Schaad und Laetsch (1935): Arch. f. Dermatol. und Syphilis, 171.

ÜBER DIE ÄNDERUNG DES GEHALTS AN VITAMIN A, B₁, B₂ UND C IN GEMÜSEN UND OBST WÄHREND DER AUFBEWAHRUNG.¹⁾

VON

MASANOBU AJISAKA, ISAMU NUMATA, KEIZABURO DOHI U.
SASUKE OKUBO.

(Aus dem Biochemischen Laboratorium des Kitasato-Instituts zu Tokyo.
Direktor: Dr. A. Fujita.)

(Eingegangen am 20. November 1941)

Wir haben die Änderung des Gehalts an Vitamin A, B₁, B₂ und C in Gemüsen und Obst während der Aufbewahrung untersucht. Die Untersuchung geschah vom Anfang Januar bis Ende März dieses Jahres. In dieser Jahreszeit waren frische Gemüse und Obst schwer zu erhalten. Zur Untersuchung kamen folgende Arten:

1. Blätter von „Hôrensô“ (*Spinacia oleracea* L.).
2. Blätter von „Daikon“ (*Raphanus sativus* L. var. *acanthiformis* Makino).
3. Blätter von „Komatuna“ (*Brassica campestris* L. var. *Komatsuna* Matsum. et Nakai).
4. Grüner Teil der Blätter von „Negi“ (*Allium fistulosum* L.).
5. Weisser Teil der Blätter sowie Zwiebel von „Negi“ (*Allium fistulosum* L.).
6. Wurzel von „Ninzen“ (*Daucus carota* L.).
7. Wurzel von „Daikon“ (*Raphanus sativus* L. var. *acanthiformis* Makino).
8. Wurzel von „Gobô“ (*Aretium Lappa* L.).
9. Knolle von „Zyagaimo“ (*Solanum tuberosum* L.).

1) Die Ergebnisse dieser Untersuchung wurden von A. Fujita am 28. März 1942 auf der Biochemischen Abteilung des 11. Japanischen Medizinischen Generalkongresses zu Tokyo mitgeteilt.

10. Fruchtfleisch von „Mikan“ (*Citrus Aurantium L.* Subsp. *nobilis* Makino).
11. Fruchtfleisch des Apfels (*Malus pumila* Mill. var. *dulcissima* Koidz.).

Jedes Gemüse war von derselben Art und soll gleichzeitig auf demselben Acker gezüchtet worden sein. Nach dem Ernten wurden sie zum Laboratorium gebracht. Die beiden Obstarten wurden nicht frisch vom Baum abgepflückt, sondern sie waren ziemlich lange aufbewahrt worden. Wie lange sie bis zur Bestimmung aufbewahrt worden waren, ist nicht bekannt. Sämtliche Gemüse und Obst wurden in Holzkästen eingelegt und im Laboratorium bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die Temperatur war meistens am Tage gegen 10°C, während sie in der Nacht manchmal unter 0°C fiel. Im März stieg die Temperatur am Tage manchmal auf etwa 20°C. Da die Vitamingehalte je nach dem Gewebeteile bedeutend verschieden sein können, wurden möglichst gleiche Gewebezteile zu sämtlichen Bestimmungen verwendet. Um die individuellen Schwankungen der Vitamingehalte kennen zu lernen, wurden bei Versuchsbeginn von etwa 5 Proben der gleichen Gewebeteile derselben Art die einzelnen Vitamingehalte bestimmt. Danach wurden die Gehalte an je einer Probe wöchentlich einmal bestimmt, bis nach 7 bis 10 Wochen, wobei manche Gewebe verdorben und faul wurden. Von den Vitaminen wurden hauptsächlich Vitamin A und zwar die einzelnen Provitamine A sowie B₁, B₂ und C bestimmt. Die verwendeten Methoden sind die in diesem Laboratorium üblichen, nämlich die Bestimmung des α - und β -Karotins nach Fujita, Narita und Ajisaka (1940), die des Kryptoxanthins nach Ajisaka (1942), die des Aneurins (als Gesamtaneurin) nach Fujita, Asari und Dohi (1941), die des Lactoflavin (als Gesamtflavin) nach Fujita und Okubo (1942) und die der Ascorbinsäure nach Fujita und Ebihara (1937). Die Provitamine A wurden von Ajisaka, Aneurin wurde von Dohi, Lactoflavin wurde von Okubo und Ascorbinsäure wurde von Numata bestimmt. Bei Geweben, die sehr wenig Provitamine A enthalten, wurde die Bestimmung derselben ausgelassen und bei den Geweben, an denen ausser α - und β -Carotine kaum oder eine

TABELLE I.
Blätter von „Hörensö“.

Von 26. Januar bis 16. März 1942 bestimmt.

Wochen aufbewahrt	Wassergehalt (%)	Vitamingehalte in mg%						C red.	ges.
		α	β	Kr	B ₁	B ₂			
0	84,9	0,28	6,48	—	0,084	0,435	198	216	
	84,6	0,69	7,60	0,06	0,084	0,371	169	192	
	85,2	0,14	2,07	—	0,081	0,348	172	173	
	86,0	0,11	2,19	—	0,159	0,442	163	186	
	85,5	0,40	6,11	0,21	0,137	0,470	179	218	
1	Mittel 85,2	0,33	4,90	0,14	0,109	0,413	176	197	
	85,4	0,32	5,06	—	0,144	0,316	133	148	
	84,0	0,23	3,72	—	0,181	0,484	102	132	
	81,4	0,71	7,23	—	0,156	0,539	36	40	
	79,5	0,62	5,78	—	0,153	0,458	1,6	1,7	
	—	—	—	—	0,119	(1,230)	0	0	
	67,2	1,01	8,60	—	0,155	(1,300)	0	0	

¹⁾ Bedeutend eingeschrumpft. Teilweise gelb verfärbt.

²⁾ Dunkelgrün verfärbt, erweicht und faul.

TABELLE II.
Blätter von „Daikon“.

Von 8. Januar bis 12. Februar 1942 bestimmt.

Wochen aufbewahrt	Wassergehalt (%)	Vitamingehalte in mg%						C red.	ges.
		α	β	Kr	B ₁	B ₂			
0	91,0	0,27	2,91	0,09	0,072	0,278	154	176	
	89,5	0,20	3,61	0,07	0,096	0,303	146	166	
	89,0	0,32	2,54	—	0,120	—	171	183	
	89,5	0,19	2,94	—	0,119	—	150	166	
	90,5	—	—	—	0,121	—	163	174	
1 ¹⁾	Mittel 90,0	0,25	3,00	0,08	0,106	0,291	151	173	
	89,5	0,13	3,02	—	0,072	0,278	126	141	
	90,0	0,19	2,94	—	0,014	0,252	82	91	
	89,5	0,25	2,41	—	0,088	0,195	50	61	
	90,2	0,33	3,41	—	0,066	(0,686)	0	0	
5 ⁵⁾	89,1	0,41	4,16	—	0,066	(0,458)	0	0	

¹⁾ Teilweise gelb verfärbt.

²⁾ Äussere Teile gelb verfärbt.

³⁾ Fast alle Teile gelb verfärbt.

⁴⁾ Teilweise faul.

⁵⁾ Sämtlich erweicht.

TABELLE III.

Blätter von „Komatuna“.

Von 30. Januar bis 20. März 1942 bestimmt.

Wochen aufbewahrt	Wassergehalt (%)	Vitamingehalte in mg%						
		α	β	Kr	B ₁	B ₂	C	
							red.	ges.
0	87,7	0,45	3,73	0,12	—	0,300	130	150
	85,3	0,42	4,87	0,17	—	0,343	138	151
	85,4	0,34	3,10	—	—	0,293	163	174
	86,7	0,39	3,52	—	—	0,243	107	137
1 ¹⁾	Mittel 86,3	0,40	3,81	0,15	—	0,295	137	153
	87,8	0,25	3,31	—	0,188	0,320	75	91
	84,7	0,35	3,41	—	—	0,300	12	19
	84,0	0,25	2,89	—	0,106	0,400	15	15
	80,2	0,21	2,99	—	0,131	0,476	1,6	3,5
	81,4	0,07	1,24	—	0,127	(0,810)	0	0

- ¹⁾ Ziemlich gelb verfärbt.
²⁾ Fast sämtlich gelb verfärbt.
³⁾ Vollkommen gelb verfärbt.
⁴⁾ Erweicht und faul.
⁵⁾ Stark stinkend.

TABELLE IV.

Grüne Teile der Blätter von „Negi“^{1,1)}

Von 27. Januar bis 17. März 1942 bestimmt.

Wochen aufbewahrt	Wassergehalt (%)	Vitamingehalte in mg%			
		B ₁	B ₂	C	
				red.	ges.
0	89,3	0,036	0,110	52,7	59,2
	89,2	0,035	0,105	56,7	57,5
	89,0	0,032	0,075	49,5	61,0
	89,0	0,020	0,066	40,5	52,2
	90,0	0,020	0,092	21,2	21,9
1	Mittel 89,3	0,029	0,090	44,1	50,4
	87,0	0,066	0,090	27,2	30,4
	88,4	0,052	0,056	21,2	28,7
	86,0	0,037	0,047	17,5	25,0
	87,5	0,026	0,095	26,0	26,1

^{1,1)} Die äusseren abgestorbenen Teile wurden vor der Bestimmung beseitigt.

TABELLE V.

Weisse Teile der Blätter sowie Zwiebel von „Negi“.
Von 27. Januar bis 17. März 1942 bestimmt.

Wochen aufbewahrt	Wassergehalt (%)	Vitamingehalte in mg%			
		B ₁	B ₂	C	
				red.	ges.
0	89,3	0,072	0,036	20,7	21,8
	89,1	0,063	0,034	20,3	23,5
	89,1	0,048	0,032	23,1	30,4
	89,3	0,025	0,019	17,0	17,4
	90,5	0,030	0,032	15,5	16,6
1	Mittel 89,5	0,048	0,030	19,3	21,9
	87,4	0,131	0,050	26,8	28,7
	87,9	0,103	0,057	20,3	25,2
	89,0	0,066	0,024	17,5	17,4
	88,0	0,038	0,033	14,7	17,4
	88,1	0,046	0,037	7,7	8,7
2					
3 ¹⁾					
4					
7 ²⁾					

¹⁾ Die Oberfläche war etwas vertrocknet.²⁾ Die getrockneten Stellen haben zugenommen.

TABELLE VI.

Wurzeln von „Ninjin“¹⁾ (einschliesslich Schale).

Von 12. Januar bis 16. Februar 1942 bestimmt.

Wochen aufbewahrt	Wasser- gehalt (%)	Vitamingehalte in mg%						C	
		α	β	γ	Kr	B ₁	B ₂		
								red.	ges.
0	93,5	2,71	7,40	—	0,09	0,029	0,038	9,8	10,4
	92,1	2,18	5,11	0,14	0,04	0,063	0,056	9,8	10,4
	93,5	4,96	8,26	—	—	0,029	0,047	4,5	5,2
	93,2	3,25	5,68	—	—	0,027	0,028	6,9	7,0
	90,0	—	—	—	—	0,038	0,025	3,7	8,7
1	Mittel 92,5	3,27	6,60	0,14	0,07	0,037	0,039	7,0	8,3
	91,5	1,95	5,23	—	—	0,078	0,038	9,8	10,4
	91,3	3,55	5,09	—	—	0,049	0,037	8,1	8,7
	90,8	3,59	8,77	—	—	0,043	0,029	6,5	7,0
	89,9	1,13	4,41	—	—	0,103	0,074	4,1	5,2
	91,0	3,24	7,85	—	—	0,066	0,037	5,7	6,1
	90,2	4,13	11,01	—	—	0,077	0,055	7,3	7,8
	88,1	3,52	7,40	—	—	0,116	0,053	4,9	7,8

¹⁾ Etwa 50 cm lang und 3 cm breit.²⁾ Nach 9 Wochen war das Aussehen fast unverändert. Hatte kleine Würzelchen getrieben.

TABELLE VII.

Wurzel von „Daikon“ (einschliesslich Schale).

Von 8. Januar bis 19. März 1942 bestimmt.

Wochen aufbewahrt	Wassergehalt (%)	Vitamingehalte in mg%			
		B ₁	B ₂	C	
				red.	ges.
0	95,1	0,023	0,024	14,2	17,4
	95,3	0,020	0,021	15,5	17,4
	95,0	0,024	0,029	17,5	19,2
	94,2	0,027	0,020	21,2	23,5
	95,4	0,024	0,024	13,0	16,5
1	Mittel 95,0	0,024	0,024	16,3	18,8
	94,5	0,031	0,023	21,1	26,0
	94,2	0,018	0,017	17,7	18,3
	94,0	0,051	0,021	17,1	22,6
	94,8	0,015	0,015	11,4	12,2
	93,8	0,012	0,013	9,8	11,3
	91,5	0,013	0,018	14,6	17,4
	91,3	0,025	0,024	7,7	10,4
	10 ²⁾	84,0	0,025	0,033	14,8
					16,5

¹⁾ An der Oberfläche traten einige erweichte, schwarz verfärbte Teile auf.
Hatte kleine Knospen angesetzt.

²⁾ Fleischteil war weniger wasserhaltig geworden.

TABELLE VIII.

Wurzel von „Gobō“ (einschliesslich Schale).

Von 21. Januar bis 20. März 1942 bestimmt.

Wochen aufbewahrt	Wassergehalt (%)	Vitamingehalte in mg%			
		B ₁	B ₂	C	
				red.	ges.
0	84,0	0,012	0,042	0,4	0,9
	83,8	0,050	0,045	0,4	1,7
	85,4	0,057	0,054	0,4	1,7
	85,2	0,021	0,047	0,4	1,7
1	Mittel 84,6	0,035	0,047	0,4	1,5
	85,1	0,053	0,078	0,4	0,7
	85,2	0,013	0,050	0,4	1,7
	85,1	0,025	0,064	0,4	0,9
	81,0	0,049	0,125	0	0,4
	80,8	0,032	0,054	0	0,4
	78,9	0,051	(0,160)	0	0

¹⁾ Etwas getrocknet.

²⁾ Etwas erweicht, Höhlenbildung.

TABELLE IX.

Knolle von „Zyagaimo“ (einschliesslich Schale).

Von 9. Januar bis 20. März 1942 bestimmt.

Wochen aufbewahrt	Wassergehalt (%)	Vitamingehalte in mg%			
		B ₁	B ₂	C	
				red.	ges.
0	83,7	0,059	0,036	10,5	10,4
	84,4	0,078	0,036	10,2	10,4
	82,5	0,081	0,035	10,2	10,4
	83,2	0,081	0,038	10,2	10,4
	82,8	0,066	0,033	10,2	12,2
1 2 3 ¹⁾ 4 5 6 ²⁾ 7 10 ³⁾	Mittel 83,5	0,073	0,036	10,2	10,8
	83,0	0,078	0,036	10,2	10,4
	83,2	0,080	0,036	10,2	10,4
	80,2	0,085	0,049	8,1	12,2
	81,1	0,103	0,040	7,3	10,4
	81,1	0,101	0,032	2,4	9,6
	80,3	0,089	0,029	8,1	9,6
	80,3	0,094	0,034	6,5	8,7
	80,2	0,103	0,033	4,9	7,8

¹⁾ Im Querschnitt war ein schwarzgrauer Ring entstanden.²⁾ Im Querschnitt sind ausser einem schwarzgrauen Ring mehrere dunkle Flecke hervorgetreten.³⁾ Keine Trocknung wurde bemerkt.

unbedeutende Menge sonstige Provitamine A zu finden sind, wurde die Bestimmung der letzteren ausgelassen. Die Ergebnisse der Bestimmungen befinden sich in Tabelle I bis XI, wobei die folgenden abgekürzten Buchstaben zur Verwendung kamen:

α : α -Karotin. β : β -Karotin. γ : γ -Karotin. Kr: Kryptoxanthin.

B₁: Aneurin. B₂: Lactoflavin. C: Ascorbinsäure. red.: Reduzierte Form der Ascorbinsäure. ges.: Gesamtascorbinsäure.

Aus den Tabellen sind die folgenden Schlussfolgerungen zu ziehen.

1. Die Vitamingehalte können individuell sehr weitgehend variieren.
2. Von den bestimmten Vitaminen ist Ascorbinsäure am unbeständigsten. Die Ascorbinsäure in grünen Blättern nimmt nach 3 Wochen Aufbewahrung bedeutend ab, um etwa nach 4 bis 7 Wochen weitgehend oder fast vollkommen zu verschwinden,

TABELLE X.
Fruchtfleisch von „Mikan“.
(auschliesslich Exo-, Meso- und Endocarp sowie Samen).

Von 28. Januar bis 18. März 1942 bestimmt.

Wochen aufbewahrt	Wassergehalt (%)	Vitamingehalte in mg%						
		α	β^*	Kr	B ₁	B ₂	C	
							red.	ges.
0	93,5	0,01	0,18	1,83	0,066	0,033	24,4	31,3
	93,4	0,01	0,27	1,68	0,043	0,050	24,8	31,3
	93,4	0,01	0,12	1,43	0,059	0,025	41,8	43,5
	92,3	0,01	0,19	1,88	0,047	0,033	34,9	46,1
1 ¹⁾	Mittel 93,2	0,01	0,19	1,71	0,054	0,035	31,5	38,1
	91,5	0,01	0,14	1,33	0,063	0,016	24,4	28,7
	93,3	0,02	0,19	1,53	0,066	0,033	33,7	40,0
	93,8	0,01	0,17	1,18	0,091	0,031	13,8	13,9
	91,4	0,02	0,19	1,94	0,084	0,014	13,4	23,5
	90,3	0,01	0,15	1,73	0,075	0	19,3	20,8

¹⁾ Es entstanden etwas erweichte Stellen.

²⁾ Teilweise faul und schimmelig. Zur Bestimmung wurden die intakten Stellen verwendet.

³⁾ Faule Stellen haben zugenommen.

⁴⁾ Meistens verdorben. Zur Bestimmung wurden möglichst die intakten Stellen verwendet.

wobei die Blätter erweichten und faul wurden. Solange die Blätter grün blieben, hatte der Ascorbinsäuregehalt kaum abgenommen. Die Ascorbinsäure in Wurzeln, Rhizomen und Obst ist ziemlich beständig. Selbst nach 7 bis 10 Wochen Aufbewahrung blieb die hauptsächliche Ascorbinsäure erhalten.

3. Die Provitamine A, Aneurin und Lactoflavin blieben bei allen untersuchten Geweben nach 5 bis 10 Wochen Aufbewahrung praktisch unverändert. Lactoflavin hatte sogar nach Fäulnis und Schimmelpilzbildung manchmal deutlich zugenommen.¹⁾ Ob diese scheinbare Fluoreszenzzunahme wirklich auf der Vermehrung des Lactoflavins beruht, muss noch durch weitere Untersuchungen erforscht werden. Da es uns aber bekannt ist, dass manche Schimmelpilze während des Wachstums unter bestimmten Beding-

1) In den Tabellen sind solche Fälle mit Klammern bezeichnet.

TABELLE XI.

Fruchtfleisch des Apfels (einschliesslich Schale).

Von 20. Januar bis 17. März 1942 bestimmt.

Wochen aufbewahrt	Wassergehalt (%)	Vitamingehalte in mg%			
		B ₁	B ₂	C	
				red.	ges.
0	90,4	0,015	0,017	5,6	7,8
	90,7	0,014	0,010	4,9	7,0
	91,0	0,012	0,014	6,1	7,0
	92,5	0,011	0,013	1,6	2,6
	90,0	0,015	0,017	6,7	7,0
1	Mittel 90,8	0,013	0,014	5,0	6,3
	90,1	0,013	0,011	6,5	7,8
	90,8	0,013	0,013	2,4	6,9
	91,1	0,013	0,011	2,4	4,4
	89,2	0,007	0,004	0	4,4
	89,4	0,009	0,011	2,4	3,5
	85,2	0,016	0	6,1	8,7

¹⁾ Teilweise sind grauweisse Flecke an der Oberfläche entstanden.²⁾ Die Frucht war etwas eingeschrumpft.

ungen sehr beträchtliche Mengen Lactoflavin bilden können, nehmen wir vorläufig an, dass sich das Lactoflavin nach Aufbewahrung wirklich vermehren kann.

Diese Arbeit wurde auf Veranlassung und unter Leitung von Herrn Dr. Akiji Fujita ausgeführt, dem wir an dieser Stelle bestens danken.

LITERATUR.

Ajisaka (1942): J. Biochem., **35**, 119.Fujita, Asari und Dohi (1941): J. Biochem., **33**, 339, 359.Fujita und Ebihara (1937): Biochem. Z., **290**, 182, 192.Fujita, Narita und Ajisaka (1940): Tokyo IZISINSI, **3185**, 9. (Vgl. auch Biochem. Z. 1941, noch nicht angekommen).

Fujita und Okubo (1942): J. Biochem. (noch nicht publiziert).

BEITRAG ZUR KENNTNIS DER TAKADIASTASE.

VON

KAZUO TOKUNAGA.

(*Aus dem Med.-Chem. Institut der Kaiserl. Kyusyu-Universität zu Fukuoka, Japan. Direktor: Prof. Dr. K. Kodama.*)

(Eingegangen am 20. November 1941)

Über die chemische Natur der Amylase gehen bisher die Meinungen der verschiedenen Autoren noch auseinander; einige behaupten, dass dieses Enzym ein Protein, andere dagegen, dass Amylase kein Protein sei.

Neuerdings berichteten Akabori und Okahara (1936), dass die chemische Natur der Takaamylase kein Protein oder Polypeptid ist. Im Gegensatz dazu hat Ninomiya (1940) die Beziehungen zwischen der Aktivität des Ptyalin und den physicochemischen Eigenschaften studiert und bestätigt, dass die Speichelamylase eine Globulin-natur besitzt.

Verf. hat also die chemischen Eigenschaften der Takadiastase untersucht und kommt zu dem Schluss, dass die Takadiastase ein Protein sei.

I. ÜBER DIE IMMUNISIERUNG MIT TAKADIASTASE.

Bei parenteraler Einführung eines Enzyms in den tierischen Organismus kann die Bildung eines Antienzyms beobachtet werden. Die Untersuchungen von Askoli und Bonfanti (1904) bewiesen, dass das Blutserum der Kaninchen, welche mit Pankreatineinspritzungen behandelt wurden, die diastatische Wirkung des Pankreasins auf Stärkesuspension hemmen kann. L. Preti (1907) berichtete über denselben Versuch, welcher für Park-Dansches Pankreatin, Takadiastase, Merk'sche Ptyalin und Maltin ähnliche Resultate lieferte. Lüers und Albrecht (1926) erkannten, dass das Blutserum der Kaninchen, welche mit gereinigten Amylasen aus Grünmalz behandelt wurden, Antiamylasewirkung hat. Ninomiya (1940) injizierte die gereinigte Speichelamylase

in die Ohrvenen der Kaninchen und erkannte die Erzeugung der Antiamylase.

Verf. hat untersucht, ob die Takadiastase Antigeneigenschaften besitzt, und ob der gebildete Antikörper die amyloytische Wirkung der Takadiastase zu stören vermag. Mit gereinigter Takadiastase immunisiertes Kaninchenserum zeigt erhebliche Praezipitation gegen die betreffende Amylase und stört deutlich die Amylasewirkung. Das Serum von Kaninchen, die mit gekochter Takadiastase immunisiert worden waren, zeigt mässige Präzipitation gegen die Amylase, die nicht gekocht wird, aber dasselbe kann die Amylasewirkung nicht stören. Die Antifерmente befinden sich in der Globulinfraktion des Serums. Die Niederschläge, die aus dem Gemisch von Takadiastase und den Antikörpern entstanden sind, besitzen auch nach Spülung mit Wasser die Stärkeverzuckerungskraft.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

1. Reinigung der Takadiastase.

50 g Takadiastase des Handels wurden in 200 cem Wasser gelöst, mit 233 cem Methanol versetzt und der von dem abgeschiedenen Niederschlag abzentrifugierten Lösung wiederum 367 cem Methanol zugefügt. Der hierbei gewonnene zweite Niederschlag wurde abzentrifugiert und in Vakuum getrocknet. 1 g des getrockneten Pulvers wurde in wenig Wasser gelöst, grosse Menge der gesättigten Ammoniumsulfatlösung zugefügt und durch einen Papierfilter filtriert. Der gewonnene Bodensatz in wenig Wasser gelöst, mittels einer Kollodiumhülse dialysiert und die Innenlösung im Vakuum getrocknet. Das getrocknete Pulver wird für die Versuche verwendet.

2. Präzipitation des immunisierten Kaninchenserums.

Als Versuchstiere dienten kräftige, ausgewachsene Kaninchen, deren Gewicht zwischen 2,5 bis 3,0 kg. betrug. Die 2%ige Takadiastaselösung wurde mit 3 tägigen Intervallen 5 mal, im ganzen 8,5 cem, subkutan am Rücken injiziert. Am 10. bis 15. Tage nach

der letzten Injektion wurde das Blut der immunisierten Kaninchen durch Herzpunktion entnommen und das Serum abgetrennt. Die Präzipitation wurde mit Schichtprobe bei Zimmertemperatur untersucht. Als Reaktionsantigen wurde eine bestimmte Verdünnungsreihe der 0,01% igen Takadiastaselösung verwendet. Die Resultate finden sich in Tabelle I.

TABELLE I.

Präzipitation der Takadiastase durch Serum von Kaninchen, die mit Takadiastase immunisiert worden waren.

Nr. 70 Kaninchen	Verdünnungsgrad der 0,01%igen Takadiastaselösung							
	1	2	4	8	16	32	64	128
Verdünnungsgrad des Serums	+	+	+	+	+	+	+	-
	+	+	+	+	+	+	-	-
	+	+	+	+	+	-	-	-
	+	+	+	+	+	-	-	-
	+	+	+	+	+	-	-	-
	+	-	-	-	-	-	-	-
	+	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-

3. Wirkung des immunisierten Kaninchenserums auf die Takadiastase.

0,01%ige Takadiastaselösung wurde mit der gleichen Menge des Kaninchenserums vermischt und 2 Stunden bei Zimmertemperatur gehalten und abzentrifugiert. Der von dem Bodensatz dekantierte klare Teil 2 ccm wurde auf 1% lösliche Stärkelösung bei 37°C gebracht. Nach 1 Stunde wurde diese gemischte Lösung nach Hagedorn'scher Methode enteiweißt und die gebildete Maltose wurde nach der Methode von Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hasse (1923) bestimmt.

Beim Kontrollversuch wurde das gleiche Verfahren mit nicht immunisiertem Kaninchenserum angestellt. Die Resultate finden sich in Tabelle II.

TABELLE II.

Wirkung des mit Takadiastase immunisierten Kaninchenserums auf die Takadiastase.

Verdünnungsgrad des Serums	Gebildete Maltose (mg)		
	(Nr. 70 Kaninchen) Immunserum + Takadiastase	(Nr. 71 Kaninchen) Immunserum + Takadiastase	(Nr. 94 Kaninchen) Kontrastserum + Takadiastase
1	11,93	10,08	61,84
2	10,78	7,82	60,90
4	22,74	5,32	60,70
8	53,12	35,30	60,28
16	59,41	59,48	58,42
32	59,41	58,76	57,59
64	59,32	58,76	57,59
∞	59,14	59,83	57,38

4. Präzipitation des mit gekochter Takadiastase immunisierten Kaninchenserums.

2%ige Takadiastase wurde gekocht und mit gleichem Teil Wasser vermischt. Die Kaninchen wurden mit dieser gekochten Takadiastaselösung immunisiert. Das Serum dieses Kaninchens wurde in gleicher Weise wie oben beschrieben behandelt. Die Resultate finden sich in Tabelle III.

TABELLE III.

Präzipitation der Takadiastase durch Serum von Kaninchen, die mit gekochter Takadiastase immunisiert worden waren.

5. Wirkung des mit gekochter Takadiastase immunisierten Kaninchenserums auf Takadiastase.

In gleicher Weise wie oben beschrieben wurde das Serum behandelt und die gebildete Maltose bestimmt. Die Resultate finden sich in Tabelle IV.

TABELLE IV.

Wirkung des mit gekochter Takadiastase immunisierten Kaninchenserums auf die Takadiastase.

Verdünnungsgrad des Serums	Gebildete Maltose (mg)		
	(Nr. 92 Kaninchen) Immunserum + Takadiastase	(Nr. 93 Kaninchen) Immunserum + Takadiastase	(Nr. 94 Kaninchen) Kontrastserum + Takadiastase
1	60,97	59,61	61,84
2	61,39	59,82	60,90
4	59,32	58,38	60,70
8	59,32	60,65	60,28
16	57,24	58,80	58,42
32	57,86	58,57	57,59
64	58,07	58,57	59,59
∞	57,24	58,38	57,38

6. Wirkung des fraktionierten Immunserums auf die Takadiastase.

Aus dem Serum wurden die Globulin- und Albuminfaktion mit halbgesättigter und mit $\frac{3}{4}$ gesättigter Ammoniumsulfatlösung fraktioniert. Nach dem Abzentrifugieren wurden die beiden Fraktionen in Kolloidumbeuteln unter fliessendem Wasser 24 Stunden dialysiert und mit gleichem Teil Wasser vermischt. In der Innenlösung, die Globulinfraktion enthält, entsteht wiederum Niederschlag. Der von dem Niederschlag abzentrifugierte klare Teil wurde mit Wasser zu gleichem Teil gebracht (G.F.I), dann der Bodensatz mit 1%iger Natriumbicarbonatelösung zu gleichem Teil gebracht und gelöst (G.F.II).

Jedes fraktionierte Serum wurde mit 0,01%iger Takadiastase-

lösung gemischt und, wie oben beschrieben, die gebildete Maltose bestimmt. Gleichzeitig wurde das nicht immunisierte Serum auch wie oben fraktioniert und behandelt. Die Resultate finden sich in Tabelle V.

TABELLE V.

Wirkung des fraktionierten Serums auf die Takadiastase.

Nr. der Kaninchen	Gebildete Maltose (mg)			
	Serum + Takadiastase	G.F.I + Takadiastase	G.F.II + Takadiastase	A.F + Takadiastase
Nr. 70(immunisiert)	11,75	0	34,08	58,69
Nr. 71(immunisiert)	10,63	0	34,25	57,42
Nr. 98(nicht immunisiert)	58,17	57,13	60,24	58,37
Nr. 77(immunisiert)	19,18	9,99	49,18	58,61
Nr. 78(immunisiert)	17,15	6,18	44,28	59,64
Nr. 84(nicht immunisiert)	59,50	59,65	61,67	59,01

7. Amyloytische Wirkung der Niederschläge aus dem Gemisch der Takadiastase und Antifermente.

0,01%ige Takadiastaselösung wurde mit der gleichen Menge der wie oben gewonnenen Globulinfraktion vermischt, 2 Stunden bei Zimmertemperatur gehalten und dann zentrifugiert. Der Bodensatz wurde mit Wasser genügend gespült, mit 1%iger

TABELLE VI.

Amylasewirkung der Niederschläge, die aus dem Gemisch der Takadiastase und fraktioniertem Serum entstanden sind.

Nr. der Kaninchen	Gebildete Maltose (mg)			
	G.F.I + Takadiastase			(gelöst in Natriumbicarbonat- lösung)
	Filtrat	Gemisch	Bodensatz	
Nr. 70(immunisiert)	49,34	0	42,60	
Nr. 96(immunisiert)	53,21	0	50,70	
Nr. 98(nicht immunisiert)	58,82	/	/	

Natriumbicarbonatlösung zu gleichen Teilen gebracht und gelöst. Jeder Teil, d. h. Gemisch, Filtrat und Bodensatz, wurde auf Stärkelösung geprüft und, wie oben, wurde die gebildete Maltose bestimmt. Die Resultate finden sich in Tabelle VI.

II. ÜBER DIE SPALTUNG DER TAKADIASTASE DURCH PROTEASEN.

Bis jetzt gibt es einige Versuche, in denen die Wirkung der Proteasen auf Amylase beobachtet wurde. Nach Ninomiya (1940) wird die Speichelamylase durch Pepsin erheblich, aber durch Trypsin und Papain nicht zerstört. Akabori und Okahara (1936) berichteten, dass die Stärkeverzuckerungswirkung der Takaamylase durch Trypsin und Papain nicht zerstört, während der Proteinteil deutlich verdaut wird. Aber die Wirkung von Pepsin auf Takadiastase wird nicht beschrieben.

Verf. hat die Wirkung von Trypsin, Papain, so wie auch Pepsin auf die Takadiastase geprüft und beobachtet, dass die Stärkeverzuckerungswirkung dieser Amylase durch Pepsin wohl zerstört und auch die Amylasesubstanz deutlich verdaut, aber durch Trypsin und Papain nicht zerstört und verdaut wird.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

1. Versuchsmaterial.

- Takadiastase: Wie oben beschrieben, gereinigte Substanz.
 Pepsin: Pepsinum pulv. solubile (E. Merk) als 1%ige Lösung.
 Trypsin: Trypsinum (G. Grübner) als 1%ige Lösung.
 Papain: Durch H₂S aktiviertes Papayotinum (E. Merk) als 1%ige Lösung.

2. Verdauung durch Pepsin.

2 ecm 1%ige Takadiastaselösung wurde mit 0.2 ecm N/10 HCl und 1 ecm Pepsinlösung vermischt ($\text{pH}=2.23$), im Wasserbad auf 40°C gehalten; in bestimmten Zeitabständen wurde das Gemisch mit N/10 NaOH neutralisiert und Amino-N dieser Lösung 1 ecm

nach Van Slyke'scher Methode zugemessen. Gleichzeitig wurde die gemischte Lösung mit Wasser 3 fach verdünnt und 1 ccm dieser Lösung auf Stärkelösung geprüft, dann wie oben beschrieben die gebildete Maltose bestimmt. Die Resultate finden sich in Tabelle VII und Tabelle VIII.

TABELLE VII.

Spaltung der Takadiastase durch Pepsin.

Verlauf. (Minuten u. Stunden)	Pepsin + Takadiastase		Gekochtes Pepsin + Takadiastase
	Amino-N (mg)	Zuwachs des Amino-N (mg)	Amino-N (mg)
0	0,0714		0,0705
5'	0,0942	0,0238	0,0705
10'	0,1189	0,0457	0,0705
15'	0,1421	0,0714	0,0705
30'	0,1638	0,0924	0,0694
45'	0,1638	0,0924	0,0714
60'	0,1697	0,0983	0,0714
3 Stdн	0,1950	0,1246	0,0714
5 Stdн	0,2126	0,1412	0,0756

TABELLE VIII.

Inaktivierung der Takadiastase durch Pepsin.

Verlauf (Minuten Stunden)	Gebildete Maltose (mg)	
	Pepsin + Takadiastase	Gekochtes Pepsin + Takadiastase
0	57,18	58,88
5'	53,57	58,88
10'	27,85	57,52
15'	24,94	57,35
30'	16,87	57,52
45'	15,85	57,52
60'	14,98	57,72
3 Stdн	14,30	19,56*
5 Stdн	14,30	15,33*

* Über die Bedeutung dieser Abnahme wird im III. Versuch die Erklärung gegeben.

3. Verdauung durch Trypsin.

0,2 g Takadiastase wurde in 2 ccm $M/15$ Phosphat Puffer von $\text{pH}=8$ gelöst, mit 1 ccm Trypsinlösung vermischt und wie oben beschrieben verfahren. Die Resultate finden sich in Tabelle IX.

TABELLE IX.
Verdauungsversuch der Takadiastase durch Trypsin.

Verlauf (Stunden)	Trypsin + Takadiastase		Gekocht. Trypsin + Takadiastase
	Amino-N (mg)	Maltose (mg)	Maltose (mg)
0	0,07038	57,71	57,86
1 Std	0,07624	57,52	57,51
5 Std	0,07432	57,71	57,69
24 Std	0,07432	57,41	57,51

4. Verdauung durch Papain.

2 ccm 1%ige Takadiastase wurde mit 1 ccm $M/10$ Citrat Puffer von $\text{pH}=5$ und 1 ccm Papainlösung vermischt und wie oben verfahren. Die Resultate finden sich in Tabelle X.

TABELLE X.
Verdauungsversuch der Takadiastase durch Papain.

Verlauf (Stunden)	Typsin + Takadiastase		Gekocht. Papain + Takadiastase
	Amino-N (mg)	Maltose (mg)	Maltose (mg)
0	0,0980	58,39	59,23
1 Std	0,1044	58,39	58,39
5 Std	0,1044	58,20	58,39
24 Std	0,1102	58,39	58,39

III. AUTOLYSE DER TAKADIASTASE.

Wohlgemuth (1912) hatte festgestellt, dass das proteolytische Ferment der Takadiastase ebenso wie es bei neutraler und alkalischer Reaktion wirkt, auch bei saurer Reaktion eine verdauende

Wirkung hervorbringt. Man könnte daran denken, dass die Wirkung bei saurer Reaktion auf dem Vorhandensein eines pepsinähnlichen Fermentes beruht. Aber Szántó (1912) lehnte diese Vermutung ab.

Verf. hat die interessante Erscheinung beobachtet, dass die dünne Lösung der gereinigten Takadiastase, die sauer durch Essigsäure, über 24 Stunden in dem Brutofen bei 37°C gehalten wurde, ihre Stärkeverzuckerungswirkung und die Eiweissreaktionen verliert. Aus diesen Tatsachen kann man feststellen, dass in der gereinigten Takadiastase noch ein dem Pepsin ähnliches Ferment enthalten ist, und dass durch diese Protease die Takadiastase sich selbst verdaut, wodurch die Stärkeverzuckerungswirkung derselben verloren geht. Diese Protease kann man durch Dialyse abtrennen.

Versuch I.

0,1%ige Takadiastase wurde mit gleicher Menge *M/1000* Essigsäure vermischt und dann im Brutofen bei 37°C gehalten; in bestimmten Zeitabständen wurde die optische Drehung und der Brechungsindex dieser Lösung gemessen, auch wie oben die amyloytische Wirkung bestimmt. Die Resultate finden sich in Tabelle XI.

TABELLE XI.

Einfluss von Essigsäure auf die dünne Lösung der Takadiastase. (I).

Verlauf (Stunden)	$[\alpha]_D^{20}$	Brechungsindex bei 40°C $H_2O = 1,3311$	Gebildete Maltose (mg)
0	-31,0	1,3321	58,90
5 Std	- 3,0	1,3216	58,03
24 Std	+15,0	1,3312	2,98
48 Std	+15,1	1,3312	1,78

Versuch II.

Nach gleichem Verfahren wurde Amino-N der 1 ccm Lösung zugemessen und die Eiweissreaktionen geprüft. Die Resultate finden sich in Tabelle XII.

TABELLE XII.
Einfluss von Essigsäure auf die dünne Lösung der Takadiastase. (II).

Verlauf (Stunden)	Amino-N	Fällungsreaktion mit Sulfosalicylsäure	Biuret-Reaktion
0	0,02388	positiv (#)	positiv (+)
5 Stdn	0,02985	positiv (+)	positiv (+)
24 Stdn	0,07761	negativ (-)	negativ (-)
48 Stdn	0,07761	negativ (-)	negativ (-)

0,1%ige Takadiastase wurde gekocht und mit Wasser zu gleichen Teilen gebracht, dann wie oben beschrieben behandelt. In diesem Falle gingen die Eiweissreaktionen nicht verloren.

Versuch III.

5 ccm 0,2%ige gereinigte Takadiastaselösung wurde in Kolloidumbeuteln unter fliessendem Wasser 1 bis 2 Tage dialysiert, mit Wasser auf 20 ccm gebracht und wie oben beschrieben behandelt. Die Resultate finden sich in Tabelle XIII.

TABELLE XIII.
Einfluss von Essigsäure auf die dünne Lösung der Takadiastase, die durch eine Kollodium hülse dialysiert worden war. (III).

Verlauf (Stunden)	Takadiastase + Essigsäure		Dialysierte Takadiastase + Essigsäure	
	Eiweiss- reaktion	Gebildete Maltose (mg)	Eiweiss- reaktion	Gebildete Maltose (mg)
0	positive (+)	61,12	positive (+)	60,96
24 Stdn	negative (-)	3,15	positive (+)	60,43

ZUSAMMENFASSUNG.

- Die gereinigte Takadiastase ist löslich in Wasser und gibt alle Eiweissreaktionen. Es wird mit halbgesättigtem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, gesättigtem Mg SO_4 , gesättigtem NaCl und durch Dialyse nicht ausgefällt, mit $\frac{2}{3}$ gesättigtem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ausgefällt.

2. Das mit gereinigter Takadiastase immunisierte Kaninchen-serum zeigt erhebliche Präzipitation gegen die betreffende Amylase und stört deutlich diese Amylasewirkung.

3. Das mit gekochter gereinigter Takadiastase immunisierte Kaninchen-serum zeigt auch mässige Präzipitation gegen die Takadiastase, die nicht gekocht wird, aber dasselbe kann die Amylase-wirkung nicht stören.

4. Die Antifermen te befinden sich in der Globulinfraktion des Serums.

5. Die Niederschläge, die aus dem Gemisch der Takadiastase und den Antikörpern entstanden sind, besitzen auch nach Spülung mit Wasser die Stärkeverzuckerungskraft.

6. Die Takadiastase wird durch Pepsin zerstört.

7. Die Takadiastase wird durch Trypsin oder Papain nicht zerstört.

8. Die gereinigte Takadiastase enthält noch ein pepsinähnliches Ferment. Durch diese Protease verdaut sich die Takadiastase selbst, wodurch die Stärkeverzuckerungskraft verloren geht.

9. Aus den obigen Resultaten möchte Verf. die chemische Natur der Takadiastase als Eiweissstoff und zwar als eine albuminartige Substanz annehmen.

Zum Schluss möchte ich Herrn Prof. Dr. K. Kodama für die Anregung und die Leitung meinen besten Dank sagen.

(Autoreferat)

LITERATUR.

- Akabori und Okahara (1936): Bulletin of chem. soc. of Japan, **12**, 55.
 Askoli und Bonfanti (1905): Z. f. physiol. Chem., **43**, 156.
 Lüers u. Albrecht (1926): Fermentforschung, **8**, 52.
 Ninomiya (1940): The Journal of Biochemistry, **31**, 69, 421.
 Preti (1907): Biochem. Zeitschr., **4**, 6.
 Szántó (1912): Biochem. Zeitschr., **43**, 31.
 Willstätter, Waldschmidt-Leitz u. Hesse (1923): Z. f. physiolog. Chem., **126**, 143.
 Wohlgemuth (1912): Biochem. Zeitschr., **39**, 325.

ÜBER DIE KATALYTISCHE DECARBOXYLIERUNG DER β -KETOCARBONSÄURE.

VON

TÔRI KUGA.

(Aus dem med.-chemischen Institut der Med. Akademie zu Chiba.

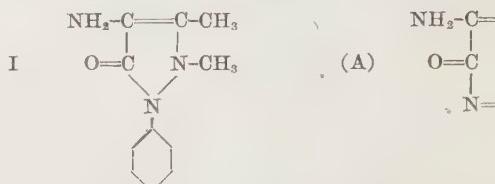
Direktor: Prof. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 26. November 1941)

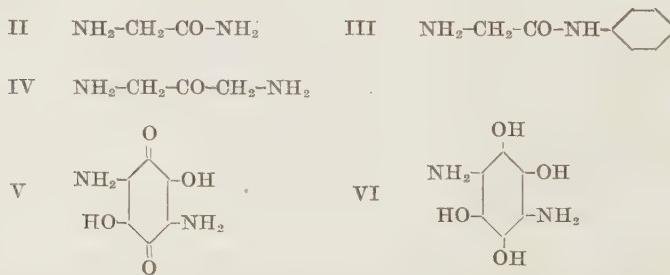
Die katalytische Decarboxylierung der β -Ketosäure durch Anilin ist schon seit den Untersuchungen von Widmark und Jeppsson(1922) und Ljunggren(1925) wohl bekannt. Beniya (1934) hat die Beziehung zwischen der chemischen Konstitution der katalysierenden Substanzen und der dadurch bewirkten Decarboxylierungsgeschwindigkeit der Acetessigsäure und Acetondicarbonsäure untersucht. Nach seinen Angaben war *o*-Phenyldiamin fast zehnfach stärker wirksam als Anilin, während die Wirkung der *m*- und *p*-Isomere beinahe gleich wie die des Anilins war. Kaneko (1938) hat den Versuch von Beniya fortgesetzt und eine enorm starke Wirkung des Amino-Antipyrins gefunden. Diese Verbindung übte wiederum eine über zehnfach schnellere Decarboxylierung der Acetessigsäure als das Anilin aus. Die CO₂-Entwicklung durch Amino-Antipyrin war tatsächlich explosiv stark. Die katalytische Reaktion durch diese Verbindung war außerordentlich interessanter Weise von der Azidität der Versuchslösung beeinflussbar und wie bei den Fermentreaktionen konnte eine optimale Azidität beobachtet werden, die von dem Dissoziationszustand sowohl der β -Ketosäure als auch des Katalysators bedingt wurde. Dieses Ergebnis scheint mir hinsichtlich der chemischen Natur des Biokatalysators sehr bedeutungsvoll zu sein, weshalb einige analytische Experimente über die Herkunft der starken decarboxylierenden Wirkung des Amino-Antipyrins unter Leitung von Prof. Akamatsu ausgeführt wurden.

Wenn man die chemische Struktur des Amino-Antipyrins (I) betrachtet, so ist in dem Amino-Pyrazolon die Anwesenheit des

chemischen Restes (A) bemerkbar.

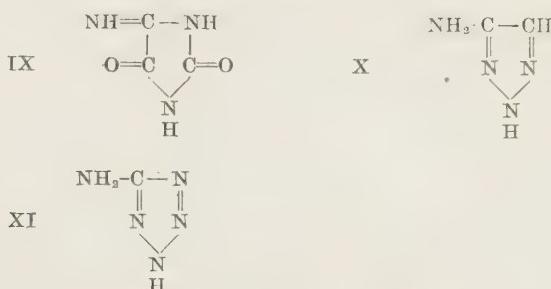


Um stark wirksame Verbindungen von einfacherem Aufbau als Amino-Antipyrin auszufinden, habe ich zuerst Glycinamid (II) auf seine Wirkung untersucht. Es war aber fast unwirksam. Indem der N-Phenylrest im Amino-Antipyrin noch berücksichtigt worden war, wurde die Wirkung des Glycinanilids (III) untersucht. Auch war dieses war fast ganz unwirksam. Es soll hier gleich noch vermerkt werden, dass sowohl Diamino-Aceton (IV) als auch Diamino-dioxy-chinon (V) fast unwirksam waren und dass das Diamino-tetraoxy-benzol (VI) auch eine schwache Wirkung äusserte.



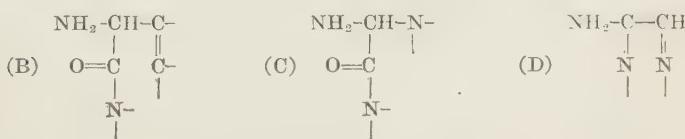
Der nächste Gedanke war, dass zur Wirksamkeit einer Amino-verbindung jener chemische Rest, nämlich $\text{NH}_2-\text{C}(=)-\text{CO}-\text{N}=$, an dem Aufbau des heterozyklischen Rings teilnehmen soll. Es wurden daher folgende Verbindungen zum Experiment gebraucht.



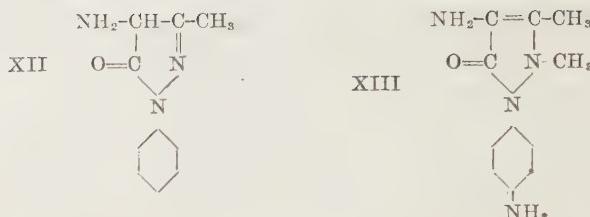


Das Amino-Oxindol (VII) ist schon nach der Untersuchung von Langenbeck (1933) als ein zur Decarboxylierung der α -Ketosäure wirksamer Katalysator bekannt. Gegen die β -Ketosäure zeigte es aber eine schwache Wirkung. Amino-Hydantoin (VIII) wirkte nur in fast gleichem Grade wie Amino-Oxindol (VII), was vielleicht mit dem ihnen gemeinsamen Atomarrangement zu tun hat. Allantoxaidin (IX), Amino-Triazol (X) und Amino-Tetrazol (XI) waren fast unwirksam.

Man sieht aus diesen negativen Ergebnissen mit Amino-Oxindol, Diamino-dioxy-chinon, Aminohydantoin und Amino-Triazol, dass solche Atomgruppierungen (B, C, D) zur Ausbildung des wirksamen Katalysators nicht hinreichend sind.



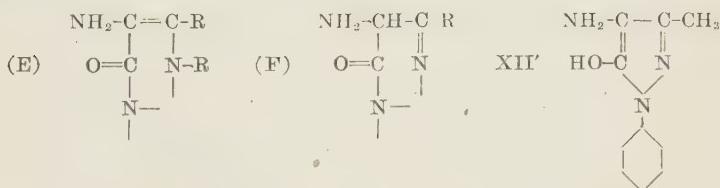
Nach vergeblicher Fahndung in verschiedenen Gebieten auf die wirksamen Verbindungen kam Verfasser wieder zu Amino-Antipyrin zurück und untersuchte auf andere Amino-Pyrazolonderivate. 4-Amino-1-phenyl-3-methyl-pyrazolon (XII) war nun in beträchtlichem Grad wirksam. Diese Verbindung ist bekanntlich unbeständig und oxydiert in Rubazonsäure. Wenn man die teilweise Inaktivierung des betreffenden Katalysators in Betracht zieht, kann man sagen, dass die N-Methylgruppe in dem Antipyrinring zur Decarboxylierung der β -Ketocarbonsäure nicht unbedingt nötig ist.



Das Einführen einer Aminogruppe an den Phenylrest des Amino-Antipyrins verursachte keine Steigerung der decarboxylierenden Wirksamkeit. 4-Amino-2,3-dimethyl-1,4'-diamino-phenylpyrazolon, d. h. 1-*p*-4-Diamino-antipyrin (XIII), war fast in gleichem Grad wirksam wie das 5-Amino-Antipyrin. Man sollte hier wohl Summation der Wirkung des Amino-Antipyrins und Anilins erwarten, die Wirksamkeit des letzteren chemischen Restes war jedoch im Vergleich mit der des Aminopyrazolons zu gering, um die Geschwindigkeit der Katalyse deutlich zu beeinflussen.

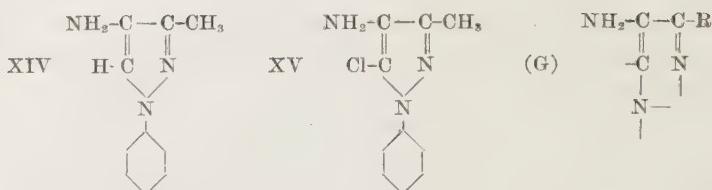
Es war nun zu prüfen, warum dem Pyrazolonring jene bemerkenswerte Eigenschaft zukommt, nach dem Verbinden mit der freien Aminogruppe zu einem sehr wirksamen Katalysator zu werden. Der Chemismus der β -Ketosäure-Decarboxylierung wird, wie von Widmark und Jeppsson (1922) und Beniya (1934) untersucht, durch intermediäre Bindung der Ketogruppe der Säure mit der Aminogruppe des Katalysators eingeleitet. Die Carboxylgruppe des β -Ketosäurerests in jenem Zwischenprodukt wird dabei labil gemacht, worauf die Kohlensäureabspaltung erfolgt. Die decarboxyierte Zwischenverbindung zerfällt dann in ihre Komponenten und der frei gemachte Katalysator verbindet sich wieder mit der β -Ketosäure, um die Reaktion aufs neue zu beschleunigen. Die Affinität der Aminogruppe mit der Carbonylgruppe der β -Ketosäure wird aber stark von der chemischen Struktur der die Aminogruppe tragenden Atomkomplexe beeinflusst. Langenbeck (1933) hat bei seinen systematischen Studien über künstliche Carboxylase eine zunehmende Aktivierbarkeit der Aminogruppe durch Phenyl-, Oxindol- und Benzoxindolreste beobachtet. Solches Verhältnis war, wie Beniya (1934) und Kaneko (1938) angegeben haben, auch bei dem β -Ketosäureabbau ersichtlich. Anilin war wirksamer

als Äthylamin. Man merkt hier den aktivierenden Einfluss des Phenylrests. Äthylendiamin übte eine stärkere Wirkung als Anilin aus und die Wirksamkeit des *o*-Phenylendiamins war weit stärker als Anilin. Benachbarte zwei Aminogruppen verstärken also gegenseitig ihre katalysatorische Wirkung. Man muss jedoch ausser dieser einfachen Aktivierung der Aminogruppe noch einen anderen Chemismus in Betracht ziehen. Um das Substrat aber möglichst der Aminogruppe anzunähern, soll der betreffende Katalysator hinsichtlich seines chemischen Baues eine möglichst nahe Verwandtschaft mit dem Substrat besitzen. Wenn aus dieser Erwägung die Struktur der Amino-pyrazolon-derivate betrachtet wird, merkt man in ihrem Pyrazolon-Ring die Anwesenheit des β -Ketosäurerests. Die Pyrazolone selbst werden im allgemeinen synthetisch aus β -Ketosäureestern und Hydrazinderivaten hergestellt, was hier keiner Rede bedarf. Man merkt ausserdem, dass die freie Aminogruppe, die sich mit der β -Ketosäure, dem abzubauenden Substrat, verbindet, gerade an dem β -Ketosäurerest des heterozyklischen Pyrazolonrings haftet. Man muss dann annehmen, dass die zur katalytischen Decarboxylierung notwendige aktive chemische Gruppe die folgende Konstitution (E u. F) aufweisen muss.



Man kann die Formel (XII) des 4-Amino-1-phenyl-3-methyl-pyrazolons auch wie (XII') schreiben.

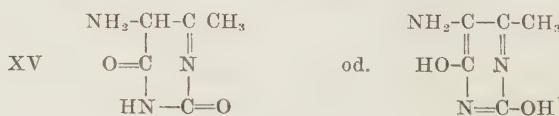
Es wurde nun untersucht, ob zur Offenbarung der oben erwähnten grossen Affinität jene O=oder OH-Gruppe in dem Pyrazolonkern (XII oder XII') eigentlich unentbehrlich sei. Die decarboxylierende Wirksamkeit des 4-Amino-1-phenyl-3-methyl-pyrazols (XIV) und 4-Amino-1-phenyl-3-methyl-5-chlor-pyrazols (XV) wurde daher geprüft.



Diese Verbindungen waren stark wirksam. Die aktive Atomgruppierung kann also wie E und G formuliert werden.

In diesen chemischen Resten ist die Aminogruppe zum Verbinden mit den β -Ketosäuren absolut nötig. Die anderen zwei Stickstoffatome sind gemäss der oben erwähnten Auseinandersetzung bei dem negativen Ergebnis mit dem Amino-Oxindol u. a. auch unentbehrlich. Kaneko (1938) hat früher auch bewiesen, dass o-Toluidin sowie β -Amino-Pyridin keine nennenswerte katalytische Wirksamkeit besitzen.

Wenn unser Schluss richtig wäre, so kann daraus gefolgert werden, dass sich die wirksamen Katalysatoren, soweit jene aktive Atomgruppierung an ihrem Molekülaufbau teilnimmt, nicht unbedingt auf die Derivate des Pyrazolons oder Pyrazols beschränken und dass die an anderen heterozyklischen Kernen aminierten Verbindungen auch zur katalytischen Decarboxylierung wirksam sein müssen. In den Pyrazolonen sowie Pyrazolen sind jene zwei Stickstoffatome direkt miteinander verbunden. Einkeilen eines Kohlenstoffatoms zwischen jene zwei Stickstoffatome verwandelt den Pyrazolring in den Pyrimidinring.



Es wurde darum die Wirkung des 5-Amino-4-methyl-uracil geprüft. Diese Verbindung war stark wirksam. Die Richtigkeit unseres Schlusses konnte damit bewiesen werden.

Angesichts der starken katalytischen Wirkung der Aminoderivate des Uracils und Pyrazols sowie Pyrazolons kann man diese Verbindungen als Fermentmodell erwähnen. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist vom Ph abhängig. Das Optimum des Amino-Anti-

pyrins liegt nach Kaneko (1938) bei PH 4.

Die modernen Fermentstudien zeigen, dass die Fermente im allgemeinen aus dem Apo-Ferment und Co-Ferment aufgebaut sind. Bei den Desmolasen wurde es schon früher in schöner Weise bewiesen und bei Phosphomonoesterase gelang auch durch Albers (1938, 1939) und Kumai (1941) die Trennung des Apo- und Co-Ferments. Dehydrierung oder Hydrolyse der Substrate wird durch das Co-Ferment bewirkt. Das Co-Ferment ist der eigentliche wirksame Anteil des Ferments. Um die Reaktionsgeschwindigkeit des Co-Ferments katalytisch zu beschleunigen, muss das Substrat dem Co-Ferment nahe gebracht und labil gemacht werden. Diese Funktion wird von dem Apo-Ferment ausgeübt. Die Wirkungsweise der Amino-Uracile und Amino-Pyrazolone als Fermentmodell in Erwägung ziehend, kann man in dem Apo-Fermentmolekül die Anwesenheit eines chemischen Restes annehmen, der wegen seiner strukturellen Identität oder Verwandtschaft mit dem Substrat gerade an der spezifischen Substratbindung des Ferments teilnimmt. Zum Zwecke der Aufstellung einer weiteren Hypothese hinsichtlich des Fermentbaus soll die Spezifitätsfrage des Ferments in zwei geteilt und untersucht werden, nämlich die Substratspezifität und die Reaktionsspezifität. Diese Reaktionspezifität ist dem Co-Ferment eigenständig. Die feine Substratspezifität des Ferments dagegen, die z. B. bei der Carbohydrase erforscht wurde, wird von dem Apo-Ferment bedingt. Dann ist das Apo-Ferment nicht ein einfaches Eiweiss, sondern ein mit einer prosthetischen Gruppe gebundenes Proteid. Diese prosthetische Gruppe soll in ihrem Molekülaufbau einen mit dem Substrat strukturell verwandten Anteil aufweisen. Eine andere chemische Gruppe soll darin ausserdem vorhanden sein, die das Substrat gegen Hydrolyse oder Dehydrierung labil macht. Man könne die Anwesenheit dieser Gruppe nicht in jenem prosthetischen Molekülteil des Apo-Ferments, sondern in dem Co-Ferment annehmen. Wenn man jedenfalls eine zweite Affinität zwischen dieser Gruppe und dem Substrat voraussetzt, soll die Hypothese des Verfassers als eine neue Modifikation der Zwei-Affinitäts-Theorie von Euler (1923) erwähnt werden. Wenn Eiweiss überhaupt als ein

Bestandteil des Ferments unentbehrlich ist, so ist es wichtig teils zum Stabilisieren jener prosthetischen Gruppe, die das Substrat spezifisch bindet, und teils zum beiderseitigen Näherhalten der betreffenden prosthetischen Gruppe und des reaktionsspezifischen Co-Ferments.

EXPERIMENTELLER TEIL.

I. Amino-Verbindungen.

Amino-Antipyrin war ein Präparat von Takeda. Sonstige Verbindungen wurden vom Verfasser selbst hergestellt.

Glycinamid: Chloracetamid wurde nach Scholl (1896) aus Chloressigäther und konzentriertem Ammoniak hergestellt und dann nach Bergell und Wülfing (1910) in Glycinamid überführt. $F=182^\circ$ (unkorr.)

Glycinanilid: Chloracetylanilin wurde nach Meyer (1875) bereitet und nach Dubsky (1917) mit alkoholischem Ammoniak in der Druckflasche erwärmt. Die gewonnene freie Base wurde aus Wasser umkristallisiert. $F=62^\circ$.

Diamino-Aceton wurde nach Kalischer (1895) durch Reduktion des Diisonitrosoacetons als salzaures Salz hergestellt. Das Diisonitrosoaceton wurde nach Pechmann und Wehsarg (1886) aus Aceton-Dicarbonsäure bereitet.

Diamino-Tetraoxybenzol: Nitranilsäure wurde nach Town (1936) aus Diacetylbenzol bereitet. Sie wurde nach Nietzki und Benckiser (1885) zu Diamino-Tetraoxybenzol reduziert und sein Chlorhydrat wurde hergestellt.

Diamino-dioxy-chinon: Zur Herstellung dieser Verbindung wurde die wässrige Lösung des salzauren Diamino-Tetraoxybenzols nach Nietzki und Schmidt (1888) mit Alkohol versetzt, die darin enthaltene Salzsäure wurde durch Hinzufügung von Natriumacetat abgestumpft und die ausgeschiedenen nadligen Krystalle wurden im Exsikkator getrocknet.

3-Amino-Oxindol: Isatinoxim wurde nach Kohn und Osterietzer (1931) bereitet und daraus Amino-oxindol-chlorhydrat nach Baeyer und Knop (1866) hergestellt.

5-Amino-Hydantoin: Allantoin wurde zuerst durch Oxydation der Harnsäure nach Vorschrift in Organic Syntheses XIII bereitet. $F=225^\circ$ (unkorr.) Allantoin wurde dann nach Biltz und Giesler (1914) über allantoxansaures Kalium und Hydroxonsäure zu 1, 3, 6-Triacetyl-5-amino-hydantoin geführt und dieses nach Biltz und Hanisch (1926) entacetyliert. Das gewonnene salzaure 5-Aminohydantoin zeigte folgende Analyse: gef. 28% N, ber. 27,6% N.

Allantoxaidin wurde nach Biltz und Giesler (1914) aus allantoxansaurem Kalium hergestellt. $F=280^\circ$ (unkorr.)

Amino-Triazol: Amido-guanidin-nitrat wurde nach Hofmann und Ehrhart (1911) hergestellt und nach Thiele und Manchot (1898) über Oxalyl-amido-guanidin und Amino-triazolecarbonsäure zu Amino-triazol geführt.

Amino-Tetrazol wurde nach Thiele (1892) aus Amido-guanidinnitrat erhalten. $F=200^\circ$ (unkorr.)

4-Amino-1-phenyl-3-Methyl-pyrazolon: 4-Isonitrosophenyl-methylpyrazolon wurde zuerst nach Michaelis (1905) bereitet, nach Knorr (1887) zur entsprechenden Amino-Verbindung reduziert und schliesslich ihr salzaures Salz hergestellt.

1-p-4-Diamino-Antipyrin wurde aus Antipyrin nach Michaelis (1911) durch Nitrieren mittels eines Salpetersäure-Schwefelsäure-Gemisches und dem folgende Reduktion in konzentrierter Salzsäure mittels Zinns hergestellt. $F=172^\circ$ (unkorr.)

4-Amino-1-phenyl-3-methyl-5-chlor-pyrazol: 4-Benzolazo-1-phenyl-3-methyl-pyrazolon wurde nach Michaelis und Schäfer (1915) aus technischem Pyrazolon und Diazobenzolchlorid hergestellt. $F=153^\circ$ (unkorr.) Dieses wurde dann nach Michaelis und Bressel (1915) zu Benzolazo-phenyl-methyl-chlorpyrazol überführt. $F=112^\circ$ (unkorr.) Aus diesem wurde nach Michaelis und Bressel (1915) durch reduktive Abspaltung des Anilins das salzaure 4-Amino-phenyl-chlor-pyrazol erhalten. $F=218^\circ$ (unkorr.)

4-Amino-1-phenyl-3-methyl-pyrazol wurde nach Michaelis und Schäfer (1915) durch Entchlorierung des Amino-phenyl-methylchlor-pyrazols durch Jodwasserstoff und roten Phosphor

erhalten. $F=89^\circ$. Es wurde in Chlorhydrat überführt. $F=209^\circ$.

5-Amino-6-methyl-uracil: 6-Methyl-uracil wurde nach Vorschrift in Organic Syntheses 17 aus Acetessigester und Harnstoff bereitet. Er wurde dann nach Behrend und Osten (1905) in 5-Nitro-6-methyl-uracil überführt und mittels Aluminium-Amalgams reduziert. Aus Chlorhydrat wurde die freie Base hergestellt. $F=250^\circ$ (unkorr.)

II. Versuchsanordnung.

Decarboxylierende Wirkung der verschiedenen Katalysatoren wurde nach Kaneko (1938) unter Gebrauch des Apparates von Kobayashi (1937) gemessen. Die Versuche wurden durchweg bei $\text{pH } 4,2$ ausgeführt. Versuchstemperatur war 0° bei Oxyfumarsäure und 37° bei Acetessigsäure. 1 ccm 1M β -Ketosäure und 0,5 ccm M/10 Katalysatorlösung wurden gebraucht. Falls M/10 Lösung der Amino-Verbindung wegen ihrer Schwerlöslichkeit nicht herstellbar war, wurde die 0,5 ccm M/10 Lösung entsprechend gewogene Substanz direkt in der zu gebrauchenden Pufferlösung gelöst.

III. Ergebnisse.

Acetessigsäure (37°)

Katalysator	CO ₂ (cem)-Entwicklung nach (Minuten)					
	5'	10'	15'	20'	25'	30'
M/10 4-Amino-antipyrin	19,1	22,1	22,4			22,4
M/10 Glycin-amid-HCl	1,95	2,05	2,15			2,15
M/10 Glycin-anilid	1,90	2,10	2,20	2,30	2,35	2,35
M/10 Diamino-aceton	0,55	1,00	1,45	1,85	2,20	2,70
M/10 Diamino-tetraoxy-benzol	3,20	4,00	4,20			4,20
M/10 Diamido-dioxy-chinon	2,26	2,91	3,01			3,01
M/10 Amino-oxindol HCl	2,05	3,10	4,10	4,35	4,75	5,00
M/10 5-Amino-hydantoin-HCl	1,95	2,50	3,10	3,60	4,10	4,65
M/10 Allantoxaidin	1,60	1,80	2,00	2,15	2,25	2,50
M/10 Amino-triazol	1,40	1,50		1,60	1,75	1,80
M/10 Amino-tetrazol	2,10	2,35	2,50	2,65	2,75	2,90

<i>M/10</i> 1-Phenyl-3-methyl-4-aminopyrazolon	9,75	15,50	18,20	19,25	20,35	20,75
<i>M/10</i> 1- <i>p</i> -4-Diamino-antipyrin	19,25	22,50	23,0	23,05		23,10
<i>M/10</i> 4-Amino-phenyl-methyl-pyrazol-HCl	8,50	12,40	15,60	18,30	19,90	21,10
<i>M/10</i> Amino-phenyl-methyl-chlor-pyrazol-HCl	7,80	11,55	14,55	17,30	19,05	20,25
<i>M/10</i> Methyl-amino-uracil	7,0	11,0	14,30	16,70	17,95	18,46
<i>M/100</i> 4-Amino-antipyrin	6,75	10,01	12,26	14,42	15,57	16,72
<i>M/100</i> 1- <i>p</i> -4-Diamino-antipyrin	6,85	11,20	14,90	17,00	18,42	19,40

Oxyfumarsäure (0°)

Katalysator	CO ₂ (cem)-Entwickelung nach (Minuten)					
	5'	10'	15'	20'	25'	30'
<i>M/10</i> 4-Amino-antipyrin	9,75	15,70	17,90	18,50	18,75	
<i>M/10</i> Glycin-amid-HCl						0,55
<i>M/10</i> Glycin-anilid						0,15
<i>M/10</i> Diamino-aceton						0
<i>M/10</i> Amino-oxindol-HCl			0,10	0,35	0,50	0,65
<i>M/10</i> 5-Amino-hydantoin-HCl	0,25		0,50			1,00
<i>M/10</i> Allantoxaidin						0,25
<i>M/10</i> Amino-triazol						0
<i>M/10</i> Amino-tetrazol						0,40
<i>M/10</i> 1-phenyl-3 methyl-4-amino-pyrazolon	2,85	4,6	6,0	7,2	8,3	9,1
<i>M/10</i> 1- <i>p</i> -4-Diamino-antipyrin	9,75	15,70	18,50	18,95	19,20	
<i>M/10</i> 4-Amino-phenyl-methyl-pyrazol-HCl	3,00	4,85	6,45	7,90	9,10	9,70
<i>M/10</i> Amino-phenyl-methyl-chlor-pyrazol-HCl	3,25	5,25	7,00	8,50	9,85	10,60
<i>M/10</i> Amino-methyl-uracil	5,0	7,75	10,02	11,77	13,27	14,27

ZUSAMMENFASSUNG.

Das Wesen der starken katalytischen Amino-Antipyrin-Wirkung auf den carboxylatischen β -Ketosäureabbau wurde erforscht und aus dem Ergebnis mit anderen Amino-Pyrazolonen wurde dann der Schluss gezogen, dass im Molekül dieser Verbindungen ausser der absolut unentbehrlichen freien Aminogruppe,

der Wirkungsgruppe, noch eine Atomgruppierung, die genetisch mit β -Ketosäure innig zusammenhängt, als Glieder des heterozyklischen Rings vorhanden ist und gerade diese chemische Gruppe das Festhalten der β -Ketosäure und das Nähern der Säure zur Amino-gruppe bewirken soll. Soweit jene Atomgruppierung im Molekül zugegen ist, können auch andere Aminoverbindungen auf die β -Ketosäure decarboxylierend wirken. Die Amino-Derivate des Pyrazols waren stark aktiv. Besonders erwähnenswert ist, dass Amino-methyl-uracil, ein Pyrimidinabkömmling, katalysatorisch wirksam ist.

Diese Untersuchungen wurden unter Leitung von Herrn Prof. Akamatsu mit der finanziellen Unterstützung ausgeführt, die dem Herrn Professor vom Unterrichtsministerium zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung zur Verfügung gestellt wurde.

LITERATUR.

- Albers, H. (1938): Ber. chem. Ges., **71**, 1913.
- Baeyer, A. u. Knop, C. A. (1866): Liebig Annal., **140**, 37.
- Behrend, R. u. Osten, H. (1905): Liebig Annal., **343**, 133.
- Beniya, K. (1934): J. Biochem., **20**, 451.
- Bergell, P. u. Wülfing, H. v. (1910): Z. physiol. Chem., **64**, 348.
- Biltz, H. u. Giesler, E. (1914): Ber. ejem. Ges., **46**, 3410.
- Biltz, H. u. Hanisch, H. (1926): J. prakt. Chem., **122**, 138.
- Dubsky, J. V. (1917): Ber. chem. Ges., **50**, 1701.
- Euler, H. v. u. Josephson, K. (1923): Z. physiol. Chem., **133**, 279.
- Hofmann, K. A. und Ehrbart, O. (1911): Ber. chem. Ges., **44**, 2713.
- Kalischer, G. (1895): Ber. chem. Ges., **28**, 1519.
- Kaneko, S. (1938): J. Biochem., **28**, 1.
- Knorr, L. (1887): Liebig Annal., **238**, 189.
- Kobayashi, C. (1936): J. Biochem., **24**, 367.
- Kohn, M. u. Osterietzer, A. (1931): Monathefte, **34**, 1741.
- Kumai, S. (1941): J. Biochem., **33**, 277.
- Langenbeck, W. (1933): Ergebnisse der Enzymforschung, **2**, 315.
- Ljunggren, G. (1924): Biochem. Z., **145**, 422.
- Meyer, P. J. (1875): Ber. chem. Ges., **8**, 1152.
- Michaelis, A. (1905): Ber. chem. Ges., **38**, 154.
- Michaelis, A. (1911): Liebig Annal., **378**, 333 u. 339.
- Michaelis, A. u. Bressel, H. (1915): Liebig Annal., **407**, 274.
- Michaelis, A. u. Schäfer, A. (1915): Liebig Annal., **407**, 238 u. 260.
- Nietzki, R. u. Benckiser, T. (1885): Ber. chém. Ges., **18**, 499.
- Nietzki, R. u. Schmidt, W. (1888): Ber. chem. Ges., **21**, 1850.

Katalytische Decarboxylierung der β -Ketocarbonsäure. 305

- Pechmann, H. v. u. Wehsarg, K. (1886): Ber. chem. Ges., **19**, 2465.
Scholl, R. (1896): Ber. chem. Ges., **29**, 2417.
Thiele, J. (1892): Liebig Annal., **270**, 45.
Thiele, J. und Manchot, W. (1898): Liebig Annal., **303**, 33.
Town, B. W. (1936): Bioch. J., **30**, 1833.
Widmark, E. u. Jeppsson, C. A. (1933): Skand. Arch. Physiol., **42**, 43.

STUDIES ON THE HETEROGENETIC ANTIGEN.

III. Studies on the antibody producing substance.

By

SHIRO FUJIMURA.

(*From the Biochemical Institute, Nagasaki Medical College, Japan.*)

(Received for publication, November 26, 1941)

INTRODUCTION.

It is a well-known fact that the alcoholic extract of some organs of animals, of the guinea-pig type, reacts with the heterogenetic antibody produced by immunizing a rabbit with an aquaous extract of the heterogenetic organs. Moreover, it is also reported that the alcoholic extract of the heterogenetic organs can be transformed into an complete antigen when mixed with a heterologous protein such as a diluted normal pig serum, and incites to develope the heterogenetic antibody when injected into rabbits. From these fact, it is considered by a number of investigators that the heterogenetic antigen is of a lipoid nature.

In the previous studies (1940, 1941), the author and Ichibakase have studied on the chemical nature of a substance which exists in the alcoholic extract of the heterogenetic organs, and which fixes a complement in the presence of the heterogenetic antibody, and it has become clear that the substance is collected almost completely in the acetone insoluble fraction, namely the crude phospholipin, of the alcoholic extract, but when the crude phospholipin is purified it loses the property as the antibody detector, and that the water soluble impurity isolated from the hydrogenated crude phospholipin is active as the antibody detector.

In the present work, I attempted to decide just what fraction of the alcoholic extract of the organs of animals of guinea-pig type has the function to develope the heterogenetic antibody when injected into rabbits.

EXPERIMENT.

*I. Immunisation experiment with the alcoholic extract of a dog kidney.**A. Preparation of the alcoholic extract of a dog kidney and method of immunisation.*

A fresh dog kidney was used for the experiment. One part of the minced tissue (freed from fat) was added to nine parts of absolute alcohol and the mixture was allowed to stand at a room temperature for a few days, with an occasional shaking. The mixture was then filtered through a filter paper and the filtrate was concentrated at a temperature under a slow current of carbon dioxide to the half its volume, and was kept at 40°C in a dark place in a stoppered bottle.

For the injection, rabbits were used, but those in which the serum, prior to the immunisation, gave a strong or complete hemolysis against sheep red corpuscles in the dilution of 1:25 in an hour under the condition of the test were excluded.

To immunize rabbits, 30 cc. of 5 per cent pig serum solution prepared with the physiological saline solution was quickly added to 3 cc. of the concentrated alcoholic extract of the dog kidney. After a lapse of one hour at a room temperature, 5 cc. of the mixture was injected into the marginal vein of a rabbit ear. The injection was carried on every day for three weeks with three day interval between each week. On the 7th day after the last injection, the blood was withdrawn for the examination of an antibody formation.

B. Determination of the degree of the hemolysin formation.

In a series of test tubes, 0.5 cc. of the rabbit serum which was immunized as above, was diluted with the physiological saline solution to 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:500 and 1:1000. To these a sufficient amount of complement serum and 0.5 cc. of 3 per cent suspension of sheep red corpuscles were added and mixed thoroughly. After allowing to stand for 1.5 hours at 37°C, the degree of the hemolysis was examined.

C. Results.

The results of the experiment are shown in the Table I. In the tables, cases where no hemolysis occurs are signed as (—) and complete hemolysis as (#), while for intermediate cases the signs (±), (+) and (⊕) are used.

TABLE I.

Test for the hemolysin formation against sheep corpuscles.
Antibody producer: Alcoholic extract of a dog kidney.

No. of rabbit	Dilution of antiserum					
	1:25	1:50	1:100	1:200	1:500	1:1000
45	#	#	+	—	—	—
46	#	#	#	#	#	—
47	#	#	#	+	—	—
48	#	#	#	+	—	—
49	#	#	#	#	—	—

From these results, it can be seen that by immunizing rabbits with the alcoholic extract of the dog kidney combined with a pig serum as a schlepper the heterogenetic antibody can be developed in the rabbit serum as previously known.

The experiments were carried on to determine what fraction of the alcoholic extract of the dog kidney is responsible for the property as an antibody producer.

II. The immunization experiment with the acetone soluble fraction and the acetone insoluble fraction of the alcoholic extract of a dog kidney.

A. Preparation of the acetone soluble and insoluble fractions.

The alcoholic extract of the dog kidney was concentrated to a syrupy consistency in a vacuum at a temperature not exceeding 40°C under a slow current of carbon dioxide. The residue was dissolved in a small amount of ether and an insoluble portion was removed by decantation. To the ethereal solution an excess of acetone was added and the precipitate which separated out was

collected. These processes were repeated three times. The precipitate thus obtained is a yellowish mass. The acetone soluble fraction was concentrated to dryness in a same manner described above. The residue was again dissolved in acetone and the insoluble portion was removed by filtration. These processes were repeated three times.

B. Method of immunization.

The both fractions obtained as above were dissolved respectively in absolute alcohol in a concentration of one per cent, and to 5 cc. of each solution 30 cc. of 5 per cent of the pig serum prepared with the physiological saline solution was added. After a lapse of one hour at a room temperature 5 cc. of this mixture was injected intravenously into rabbits in the same way as in the case of the alcoholic extract.

C. Results.

The results obtained in these experiments are as follows.

TABLE II.

Test for hemolysin formation against sheep red corpuscles.

Antibody producer: Acetone soluble fraction of the alcoholic extract of a dog kidney.

No. of rabbit	Dilution of antiserum				
	1 : 25	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 500
50	+	-	-	-	-
51	#	-	-	-	-
52	+	-	-	-	-
53	-	-	-	-	-

As can be seen from these results, the heterogenetic antibody can only be produced by the injection of the acetone insoluble fraction of the alcoholic extract of a dog kidney and it is therefore said that the function of the alcoholic extract of a dog kidney to form the heterogenetic antibody in the rabbit serum does not depend on the acetone soluble fraction but on the acetone insoluble

TABLE III.

Test for hemolysin formation against sheep red corpuscles.
 Antibody producer: Acetone insoluble fraction of the alcoholic extract of a dog kidney.

No. of rabbit	Dilution of antiserum				
	1 : 25	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 500
55	#	#	#	#	-
56	#	#	#	+	-
57	#	#	#	#	-
58	#	#	#	#	-

fraction, namely the phospholipin fraction, of the alcoholic extract.

The nitrogen and the phosphorous contents of the phospholipin fraction were estimated by micro-Kjeldahl and Youngburg's methods respectively. The atomic ratio of N:P is 1.68, and it is therefore considered that nitrogen containing impurities are present in the phospholipin fraction.

III. Immunization experiment with the purified phospholipin.

The experiment was carried on to decide whether or not the phospholipin in the purified state is also active as a producer of the heterogenetic antibody.

A. Purification of the crude phospholipin.

The crude phospholipin prepared from a dog kidney was purified through the cadmium lipoid double salt as follows.

To the alcoholic solution of the crude phospholipin the saturated alcoholic solution of cadmium chloride is added, and the phospholipin is precipitated as a double salt. The lipoid cadmium double salt is freed from the mother liquid by centrifugation and washed with absolute alcohol until the yellow colouration disappears. The lipoid cadmium double salt is then suspended in hot alcohol and decomposed by adding little by little a powdered ammonium carbonate until the solution becomes weakly alkaline

against a litmus paper. After heating in the boiled water bath for about 20 minutes, the solution is filtered while hot. To the filtrate, the alcoholic cadmium chloride solution is added and the lipoid is re-precipitated. After washing with absolute alcohol the double salt is recrystallized from the mixture of alcohol and acetic ester (1:2). The crystals are then suspended in hot alcohol and decomposed with ammonium carbonate. The filtrate is evaporated to a syrupy consistency at a temperature not exceeding 40°C, and the residue is dissolved in a small amount of ether. To the ethereal solution an excess of acetone is added and the phospholipin is precipitated. The dissolution and the precipitation are repeated three times. The phospholipin thus purified is a white mass and its N:P ratio is 1:1.1.

B. Method of immunization.

The rabbits are immunized with the purified phospholipin in the same way as in the case of the crude phospholipin.

C. Results.

The results of the experiment are as follows.

TABLE IV.

Test for hemolysin formation against sheep corpuscles.

Antibody producer: Purified phospholipin from a dog kidney.

No. of rabbit	Dilution of antiserum				
	1 : 25	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 500
61	+	-	-	-	-
62	+	-	-	-	-
63	-	-	-	-	-
64	-	-	-	-	-
65	+	-	-	-	-

It is obvious from the results that the purified phospholipin of a dog kidney lacks the property to produce the hemolysin against sheep corpuscles and the activity of the crude phospholipin as a heterogenetic antigen does not depend on the lipoid itself but

peraphaps on the impurity contained in it.

The experiment was proceeded to determine the fact that the activity of the crude phospholipin as the heterogenetic antigen depends on its impurity.

V. Experiment with the chloroform soluble fraction and the water soluble fraction of the hydrogenated crude phospholipin.

The isolation of the water soluble impurity of the crude phospholipin was attempted. For this purpose the crude phospholipin was hydrogenated by means of platinum black. The hydrogenation of the lipoid makes it more hydrophilic, and consequentry it becomes more separable from the water soluble impurity.

A. Hydrogenation of the crude phospholipin.

2 g of a platinum black are suspended in 200 cc. of 2 per cent alcoholic solution of the crude phospholipin and the mixture is saturated at 60°C with hydrogen gas, which is purified by bubbling through a saturated mercuric chloride solution, 2 per cent permanganate solution and 5 per cent sodium hydroxide solution in succession. After the disappearance of the yellowish colour, which occurs usually when the current of hydrogen gas is passed through for 30 minutes, the hydrogen gas was bubbled through for one hour more, and the mixture is left for the sedimentation of the platinum black at 60°C for about 30 minutes, and filtered while hot. The filtrate freed from the platinum black is colourless and the white precipitate separates out as cooling proceeds. After the removal of the separated hydrophospholipin, the hydrogenation of the filtrate is repeated once more and filtered while hot. The alcoholic filtrate is evaporated in a vacuum at 50°C and mixed with the hydrogenated lipoid preecipitate which is obtained by the first hydrogenation. The hydrogenated impure lipoid thus obtained is a white powder.

B. Isolation of the water soluble fraction of the hydrogenated phospholipin.

The hydrogenated impure phospholipin is dissolved in chloro-

form and after the addition of a small amount of alcohol, it is extracted several times with water at pH 2. The chloroform fraction is evaporated at 40°C and recrystallized three times from acetic ester. The water soluble fraction is washed several times with chloroform, neutralized with sodium hydroxide and then evaporated dry in vacuum. The water soluble, chloroform insoluble fraction showed Biuret and Millon's reactions and precipitation with sulphosalicylic acid.

C. Method of immunization.

The rabbits were immunized with the chloroform soluble and the water soluble fraction of the hydrogenated crude phospholipin from a dog kidney and the formation of the heterogenetic antibody were tested.

The chloroform soluble fraction was dissolved in absolute alcohol in the concentration of one per cent and used as a antibody producer in the same way as in the case of the crude phospholipin. The water soluble fraction was injected three times with an interval of 7 days between each injection, using 5 cc. of one per cent solution at a time.

D. Results.

The results of the experiments are shown in Table V and VI.

TABLE V.

Test for hemolysin formation against sheep corpuscles.

Antibody producer: Chloroform soluble fraction of the hydrogenated phospholipin from a dog kidney.

No. of rabbit	Dilution of antiserum				
	1 : 25	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 500
71	#	-	-	-	-
72	-	-	-	-	-
73	+	-	-	-	-
74	-	-	-	-	-
75	+	-	-	-	-

TABLE VI.

Test for hemolysin formation against sheep corpuscles.

Antibody producer: Water soluble fraction of the hydrogenated Phospholipin from a dog kidney.

No. of rabbit	Dilution of antiserum				
	1 : 25	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 500
76	#	#	+	-	-
77	#	#	#	-	-
78	#	#	#	-	-
79	#	#	+	-	-

From these results, it is considered that the property of the crude phospholipin from a dog kidney to produce the heterogenetic antibody depends entirely on the impurity which is contained in the lipoid and becomes separable from it by the hydrogenation of the unsaturated lipoid.

VI. Immunization experiment with the globulin prepared from a dog kidney.

A. Preparation of the globulin from a dog kidney.

The minced dog kidney is extracted with acetone several times followed by ether, and then it is dried at 40°C. After thoroughly grounded, it is again extracted with ether in the Soxlet apparatus until none is extracted. The dried powder of a dog kidney thus obtained is dissolved in physiological saline solution and the insoluble portion is removed by filtration. To the filtrate, ammonium sulfate is added in a concentration of half a saturation, and the separated precipitate is collected by a centrifugation and washed several times with the half saturated ammonium sulfate solution. The precipitate is then dialysed in a collodium membrane against a running water until a reaction of an ammonium disappears.

B. Method of immunization.

5 cc. of the one per cent of the globulin obtained as above is injected into rabbit three times with an interval of 7 days between

each injection. On the 7th day after the last^{*} injection, the serum is withdrawn for the hemolysin formation test.

C. Results.

The results of the experiment are as follows.

TABLE VII.

Test for hemolysin formation against sheep corpuscles.

Antibody producer: Globulin from a dog kidney.

No. of rabbit	Dilution of antiserum				
	1 : 25	1 : 50	1 : 100	1 : 200	1 : 500
94	#	#	#	+	-
95	#	#	#	#	-
96	#	#	#	#	-
97	#	#	#	+	-

As can be seen from the results, the globulin prepared from a dog kidney has also the property to produce the heterogenetic antibody when injected into rabbits.

VIII. The serological relation between heterogenetic antibodies and the stroma of the sheep red corpuscles.

In the above experiments, it has become clear that the heterogenetic antibodies can be produced by the injection of the water soluble impurity which is contained in the crude phospholipin prepared from the heterogenetic organs such as a dog kidney, and be considered perhaps to be a substance of a protein nature.

In this section, the experiments were performed to determine what fraction of the sheep corpuscles is serologically identical with the heterogenetic antibody producing substance.

The tests were attempted by the complement fixation reaction according to Browning's method, using the immunosera which were obtained in the previous section and the stroma of sheep corpuscles as an antibody detector. The method of the prepara-

tion of the stroma of sheep corpuscles is as follows.

The erythrocytes were separated as much as possible from the defibrinated sheep blood by centrifugation, and washed three times with the addition of physiological saline solution and subjected to centrifugation each time. The erythrocytes were hemolyzed with the addition of as five times as large volume of distilled water, and the stroma were precipitated from the solution by bubbling carbon dioxide gas through it. The precipitate was washed repeatedly with distilled water until no colouration was observed in the supernatant liquid. Then to the suspension of the stroma thus obtained, a solution of sodium hydroxide was added little by little until it became slightly alkaline, and a homogenous suspension of the stroma was performed. To this solution a current of carbon dioxide gas was passed through to precipitate the stroma again, and the same procedure of washing was repeated as above, until the stroma became colourless. Then the stroma was dried in vacuum at a temperature of 40°C and obtained as a slightly coloured powder.

The results of the complement fixation reaction, using the stroma solution as an antibody detector are as follows.

TABLE VIII.

Complement fixation reaction.

Antibody producer: Aleoholic extract of a dog kidney.

Antibody detector: Stroma of sheep corpuscles.

No. of rabbit	Unit of compl.					Detector + Complement	Antiserum + Complement
	2	4	6	8	10		
45	—	#	#	#	#	#	#
46	—	—	—	#	#		#
47	—	—	#	#	#		#
48	—	—	+	#	#		#
49	—	—	—	#	#		#

TABLE IX.
Complement fixation reaction.

Antibody producer: Acetone soluble fraction of the alcoholic extract of a dog kidney.

Antibody detector: Stroma of sheep corpuscles.

No. of rabbit	Unit of compl.					Detector + Complement	Antiserum + Complement
	2	4	6	8	10		
50	+	#	#	#	#	#	#
51	#	#	#	#	#		#
52	#	#	#	#	#		#
53	#	#	#	#	#		#

TABLE X.
Complement fixation reaction.

Antibody producer: Acetone insoluble fraction of the alcoholic extract of a dog kidney.

Antibody detector: Stroma of sheep corpuscles.

No. of rabbit	Unit of compl.					Detector + Complement	Antiserum + Complement
	2	4	6	8	10		
55	-	+	#	#	#	#	#
56	-	+	#	#	#		#
57	-	-	#	#	#		#
58	-	-	#	#	#		#

TABLE XI.
Complement fixation reaction.

Antibody producer: Purified phospholipin from a dog kidney.

Antibody detector: Stroma of sheep corpuscles.

No. of rabbit	Unit of compl.				Detector + Complement	Antiserum + Complement
	2	4	6	8		
61	#	#	#	#	#	#
62	#	#	#	#		#
63	#	#	#	#		#
64	#	#	#	#		#
65	#	#	#	#		#

TABLE XII.

Antibody producer: Chloroform soluble fraction of the hydrogenated phospholipin from a dog kidney.

Antibody detector: Stroma of sheep corpuscles.

No. of rabbit	Unit of compl.				Detector + Complement	Antiserum + Complement
	2	4	6	8		
71	#	#	#	#	#	#
72	#	#	#	#	#	#
73	#	#	#	#	#	#
74	#	#	#	#	#	#
75	#	#	#	#	#	#

TABLE XIII.

Complement fixation reaction.

Antibody producer: Water soluble fraction of the hydrogenated phospholipin from a dog kidney.

Antibody detector: Stroma of sheep corpuscles.

No. of rabbit	Unit of compl.					Detector + Complement	Antiserum + Complement
	2	4	6	8	10		
76	-	#	#	#	#	#	#
77	-	-	#	#	#		#
78	-	+	#	#	#		#
79	-	+	#	#	#		#

TABLE XIV.

Complement fixation reaction.

Antibody producer: Globulin from a dog kidney.

Antibody detector: Stroma of sheep corpuscles.

No. of rabbit	Unit of compl.					Detector + Complement	Antiserum + Complement
	2	4	6	8	10		
94	-	#	#	#	#	#	#
95	-	-	#	#	#		#
96	-	-	#	#	#		#
97	-	#	#	#	#		#

As can be seen from the above tables, the antiserum in which the hemolysin against sheep corpuscles are formed fixes complements in the presence of the stroma of sheep corpuscles. This fact indicates that in the stroma of sheep corpuscles exists the substance which is serologically identical with the heterogenetic antibody producing substance.

The experiments were attempted to determine what is the substance which is contained in the stroma of sheep corpuscles and reacts with the heterogenetic antibody. For this purpose the stroma of sheep corpuscles were separated into the chloroform soluble and the water soluble fraction. The method is as follows.

Into 200 cc. of one per cent of suspension of the stroma of sheep corpuscles, hematoporphyrin is added in a concentration of 0.1 per cent. After standing for one hour in a dark place, the mixture is irradiated in the Petri dish for three hours with two 1000 watt electric lamps at a distance of 30 cm., avoiding an excessive heating by cooling it with an electric fan. The irradiated stroma suspension is made to pH 3 by addition of 0.1*N* hydrochloric acid and then mixed well with the same volume of alcohol. To the mixture the same amount of ether is added and shaken well. The ethereal fraction is removed and the water fraction is treated repeatedly with ether as above until nothing is extracted in the ethereal portion. The water soluble fraction is neutralized and sodium chloride is dissolved in a concentration of 0.85 per cent. The ether soluble fractions are added together and evaporated completely in a vacuum at a temperature of 40°C under a slow current of carbon dioxide gas. The dried material is dissolved in a mixture of 1 part of alcohol and 3 parts of ether and the filtrate is then evaporated. The chloroform solution of this dried material is shaken with water in order to remove the mixed hematoporphyrin. The chloroform is evaporated and the residue is dissolved in ether. The insoluble substance is removed by centrifugation and the ether is evaporated.

Using these fractions of the stroma of sheep corpuscles as an antibody detector respectively, the complement fixation reactions were performed against the heterogenetic antiserum above obtained.

The results are shown in a Table XIV.

TABLE XIV.
Complement fixation reaction.
Antibody producer: Lipoid fraction of the stroma.

No. of rabbit	Antibody detector	Unit of compl.				Detector + Complement	Antiserum + Complement
		2	4	6	8		
45	Alcoholic extract of a dog kidney	#	#	#	#	#	#
46	"	#	#	#	#		#
47	"	#	#	#	#		#
48	"	#	#	#	#		#
55	Crude phospholipin of a dog kidney	#	#	#	#	#	#
56	"	#	#	#	#		#
57	"	#	#	#	#		#
58	"	#	#	#	#		#
76	Water soluble fraction of a hydrolipin	#	#	#	#	#	#
77	"	#	#	#	#		#
78	"	#	#	#	#		#
79	"	#	#	#	#		#
94	Globulin from a dog kidney	#	#	#	#	#	#
95	"	#	#	#	#		#
96	"	#	#	#	#		#
97	"	#	#	#	#		#

TABLE XV.
Complement fixation reaction.
Antibody producer: Water soluble fraction of the stroma.

No. of rabbit	Antibody detector	Unit of compl.				Detector + Complement	Antiserum + Complement
		2	4	6	8		
45	Alcoholic extract of a dog kidney	+	#	#	#	#	#
46	"	-	#	#	#		#
47	"	-	#	#	#		#
48	"	+	#	#	#		#

55	Crude phospholipin of a dog kidney	-	#	#	#	#
56	"	-	#	#	#	#
57	"	+	#	#	#	#
58	"	-	#	#	#	#
76	Water soluble fraction of a hydrolipin	#	#	#	#	#
77	"	-	#	#	#	#
78	"	+	#	#	#	#
79	"	+	#	#	#	#
94	Globulin from a dog kidney	-	#	#	#	#
95	"	-	#	#	#	#
96	"	-	#	#	#	#
97	"	-	#	#	#	#

It is clear from the results that only the water soluble fraction of the stroma is active as an antibody detector against the heterogenetic antibody.

SUMMARY.

1. The heterogenetic antibody can be produced in a rabbit serum by the immunization with the alcoholic extract of a dog kidney, combined with a pig serum as a schlepper. The active substance as an antibody producer is contained in the acetone insoluble portion of the alcoholic fraction, namely the phospholipin, whereas the acetone soluble fraction of the alcoholic extract lacks the heterogenetic antibody producing property.
2. The phospholipin fraction of the alcoholic extract of a dog kidney loses the heterogenetic antibody producing property, when purified by a cadmium lipoid double salt method.
3. When the crude phospholipin is hydrogenated and separated into a water soluble and the chloroform soluble fraction, the active substance as an antibody producer is collected only in the former fraction.
4. The globulin prepared from a dog kidney has a property to produce the heterogenetic antibody in the rabbit serum when injected.

5. The stroma of sheep red corpuscles fixes complement in the presence of the heterogenetic antibody, and the active substance as an antibody detector is collected only in the water soluble fraction.

For this research, the expense of the work was paid from a grant given by the Ministry of Education to which we gratefully extend our appreciation.

REFERENCES.

- Forssman (1911): Biochem. Zeitschr., **37**.
Landsteiner and Simms (1923): Jour. of exper. med., **47**.
Sachs and Guth (1920): Med. Klin., No. 6; Zeitschr. für Immunität., **30**.
Fujimura (1940): Jour. of Biochem., **32**.
Fujimura and Ichibakase (1941): Acta Medica Nagasakiensis, II.



EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE BEZIEHUNGEN ZWISCHEN B-VITAMIN UND KOHLEHYDRATSTOFFWECHSEL.

VON

YUZO OKUGAWA.

(*Aus dem Biochemischen Institut des Präfekturkrankenhauses zu Kobe.
Vorstand: Dr. M. Takeda.*)

(Eingegangen am 30. November 1941)

I. EINLEITUNG.

Es ist schon von Autoren festgestellt, dass bei Geflügel und Säugetieren das Fehlen des B-Vitamininkomplexes eine Störung des Kohlehydratstoffwechsels hervorbringt. Zuerst sind bezüglich des Kohlehydratstoffwechsels von Funk und Schönborn (1914) bzw. Ogata (1920) bei B-avitaminösen Tieren Versuche angestellt worden, um eine Hyperglykämie bei avitaminösen Vögeln festzustellen. Eine systematische Untersuchung über den intermediären Kohlehydratstoffwechsel erfolgte aber erst im Jahre 1922 bei Collazo.

Bei B-vitaminfrei ernährten Tieren hat Collazo eine starke Hyperglykämie nachgewiesen, welche einer initialen Hypoglykämie folgt und gegen das Endstadium der Krankheit oft wieder etwas abklingt. Weiter hat er dabei eine Verminderung der Toleranz für Kohlehydrate und eine Verarmung des Glykogens festgestellt und zwar mehr in der Leber als in den Muskeln. Schliesslich kam er zum Schluss, dass der Mangel an B-Vitamin eine Störung des Kohlehydratstoffwechsels hervorbringt, die zwar mit der diabetischen Stoffwechselstörung in den Erscheinungen durchaus, aber mit denen der Zuckerkrankheiten gar nicht übereinstimmt.

Die aus allen diesen Untersuchungen über den Kohlenhydratstoffwechsel bei B-Avitaminosen erreichten Resultate lassen sich wie folgt zusammenfassen: Soweit es sich um die Untersuchungen über den Gehalt an Blutzucker bei B-Avitaminosen handelt, wollen

wir ausser den obengenannten noch eine Reihe von Untersuchungen erwähnen, welche einstimmig eine Zunahme des Blutzuckergehaltes genannt haben, wie Hosoda bei Tauben, Hirai bei Ratten und Hosokawa bei Kaninchen. Weiter hat Okamoto bei B-Mangelkrankheiten über den hydrolysierbaren Reduktionswert Versuche vorgenommen. Ferner haben Collazo und Morelli zum ersten Male bei B-Avitaminosen eine Vermehrung der Blutmilchsäure und in den Organen die Retention der Milchsäure festgestellt, was mit dem Resultate von Rosenwald und Negri übereinstimmte. Die von Rubino und Collazo gefundene Tatsache, dass die Leber bei B-Avitaminosen je nach dem Stadium der Krankheit glykogenarm oder-frei sei, ist inzwischen von vielen Autoren bestätigt worden. (Abderhalden, Tanaka).

Bei dem Hefeauteolytate wurde schon (1923) von Collip, Funk und Bickel eine Wirkung im Sinne einer Blutzuckersenkung hervorgehoben und es ist von Bickel und Collazo bei den avitaminösen Tieren festgestellt worden, dass durch eine Insulininjektion nicht nur die Hyperglykämie beseitigt werden kann, sondern auch die Leber wieder mit Glykogen angereichert wird.

Andererseits erhebt sich bei der Wirkung der Hefe bzw. der Reiskleie für Blutzuckersenkung und Glykogenbildung die Frage, ob die Wirkung spezifisch ist und ob in diesen Stoffen insulinähnliche Substanzen enthalten sind.

Es gelang überdies Collip, Winter und Smith, Funk und Corbit sowie Gottschalk aus der Hefe Glukokinin herzustellen, dessen Wirkung der des Insulins ähnlich ist. Nach Glaser und Halpern ist bei dem Hefeauteolytate eine aktivierende Wirkung auf Insulin wahrzunehmen. Im Zusammenhang mit den Vorgenannten haben hiermit Collazo und Pi-Suner mit ihren eingehenden Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus von Insulin und Hefe auf den Kohlehydratstoffwechsel bei B-Avitaminosen darauf hingewiesen, dass eine durch Mangel an B-Vitamin hervorgerufene Krankheit nur mit B-Vitamin, nicht ein einziges Mal mit Insulin (das sich dabei nur auf seine gewöhnliche Wirkung beschränkt), heilbar ist.

Die in der B-Gruppe enthaltenen Vitamine überhaupt sind heutzutage nach ihren physikalischen und biologischen Eigenschaften in viele Gruppen eingeteilt worden. Im Laufe der letzteren Jahre haben sich auch viele Forscher mit dem Studium der Stoffwechselstörung beschäftigt, um zu erklären, welche Faktoren der B-Vitamine dabei die Hauptrolle spielen dürften.

Es ist hervorgehoben worden, dass bei den B₁-Avitaminosen Hyperglykämie (Takahashi) bzw. Leberglykogenverarmung (Oshima, Takahashi und Murakami) auftritt und eine Verabreicherung des Vitamins B₁ eine beträchtliche Blutzuckersenkung (Takahashi) und einen Aufstieg des Leberglykogens (Ariyama) mit sich bringt. Nakamura (1936) hat bei seinen Untersuchungen an Ratten von B₁- bzw. B₂-Avitaminosen eine Verminderung des Leberglykogens nachgewiesen.

Die Untersuchungen von Collazo und Pi-Suner-Bayo über die Störungen des Zuckerhaushaltes bei B-Avitaminosen, bei denen erhitztes Hefeautolysat unter vollkommener Zerstörung von B₁-Vitamin zur Anwendung kam, ergaben, dass die Regulierungsfunktion des Kohlehydratstoffwechsels bei B-Avitaminosen ausschliesslich dem B₂-Vitamin zuzuschreiben ist.

In neuerer Zeit bildet das Studium der Beziehungen zwischen B₁-Vitamin und Herzstörung eine brennende Frage, so ist zum Beispiel von Wirkins, Jones und Sure, Bickel, Strauss, Parade, Schröder angenommen worden, dass die im Verlauf der B₁-Avitaminosen entstehende Herzinsuffizienz auf eine Störung des Kohlehydratumsatzes im Herzmuskel zurückzuführen ist.

Ausserdem wurde mit experimentellen Versuchen bei normalen Kaninchen (Lajos, Tislowitz) eine blutzuckersenkende und leberglykogenvermehrnde Wirkung des B₁-Vitamins festgestellt, dagegen wurden aber keine Beeinflussungen des B₁-Vitamins auf den Blutzucker beobachtet (Gutmann, Kallfelz, Drigalski).

Allerdings sind bezüglich der Forscher die Resultate ganz verschieden. Bei Verfolgung aller dieser Resultate kann man leicht ersehen, dass die Hauptrolle bei der Regulierung des Kohlehydratstoffwechsels bei B-Avitaminosen auf das Vitamin B₁ zurückzuführen ist, wie einige Forscher betonen, während sie nach anderen

Forschern dem Vitamin B₂ zuzuschreiben ist.

Dabei stimmen aber die Resultate der Untersuchungen insbesondere bezüglich der Wirkung des einzelnen Faktors der B-Vitamine auf den Kohlehydratstoffwechsel nicht überein. Diese Meinungsverschiedenheiten über die Beziehungen zwischen den einzelnen Faktoren und den Störungen des Kohlehydratstoffwechsels dürften auf den Verschiedenheiten der Herstellungsverfahren der Vitamine und der Fütterungsweise beruhen. Um die Beziehungen zwischen den einzelnen Faktoren der B-Vitamine und dem Kohlehydratstoffwechsel zu erklären, scheint es mir von Interesse zu sein, zunächst unter systematischer und genauerer Analyse des Blutes und der Organe den Zuckerspiegel zu erforschen, indem die Fütterung mit einem einzelnen Faktor der B-Vitamine zwangsweise vor sich geht.

Als Zuckerspiegel des Blutes und der Organe habe ich ausser dem Blutreduktionswert und dem Glykogengehalt der Leber die folgenden Zuckerarten herangezogen. Es wurden Versuche zur folgenden Analyse angestellt, indem Blut, Gehirn, Brustmuskel und Leber unter verschiedenen Bedingungen herangezogen wurden:

1. Blutzuckerbilder; Gesamtreduktionswert, wirklicher Zuckergehalt, Restreduktionswert und hydrolysierbarer Zucker (gebundener und freier) des Blutes.

2. Zuckerspiegel der Organe; Glykogengehalt, freier wirklicher Zuckergehalt und hydrolysierbarer Zuckerwert der Leber, der Muskeln und des Gehirns.

In den bisherigen Arbeiten beschränkt man sich nur auf eine Bestimmung des Glykogengehaltes in der Leber oder in den Muskeln, um ein Merkmal der Zuckerhaushaltstörung zu erhalten. Yamamoto (aus unserem Institut) meinte, dass es unbedingt notwendig sei, ausser dem Glykogengehalt in den Organen noch den Spiegel anderer Zucker, wie des wirklichen und des hydrolysierbaren Zuckers zu untersuchen, um ein klares Bild des Kohlehydratumsatzes in den Organen darbieten zu können.

Da die Avitaminose aber manchmal durch den einheitlichen Hunger mit der Unterernährung vergesellschaftet ist, so ist es schwer zu bestimmen, inwieweit die sich zeigenden krankhaften

Veränderungen auf das Fehlen des Vitamins oder einfach den Hunger zurückzuführen sein werden. Deshalb bin ich immer bei meinen Versuchen bei der zwangsweisen Fütterung mit B-vitaminfreier Nahrung geblieben, um ein vergleichendes Bild der Zuckerspiegel bei den avitaminösen und hungernden Tieren zu erzielen.

II. METHODISCHES.

A. Zubereitung der Vitaminmaterialien, welche in meinen Versuchen zur Anwendung kamen.

Als B₁-Avitaminose-Diät habe ich der Taube folgende Nahrung mit zwangsweiser Fütterung verabreicht: Reismehl 81,0%, Casein 10,0%, Salzmischungen nach Mc. Collum 4,0%, Lebertran 2,0%, Orangensaft 1,0%, Hefepräparat (Ebios; 3 Stunden auf 120° C erhitzt.)

B. Bestimmungsverfahren.

Die Bestimmung des Blutes und Organanalyse wurden auf folgende Weise ausgeführt:

a) Das Blut wurde der V. jugularis entnommen und sofort der Reduktionswert nach der Methode von Hagedorn-Jensen, der wirkliche Zuckerwert nach der Methode von Doi mittels Hefe, der hydrolysierbare Zuckerwert (mit gebundenem und freiem) nach der Orcin-Methode von Yamamoto bestimmt.

b) Zur Bestimmung von Glykogen, wahrem Zucker und hydrolysierbaren Zucker in den Organen benutzte ich die Orcinschwefelsäure-Methode nach Yamamoto. Die Versuchstiere starben alle durch Ausblutungen. Aus der Leber, dem Muskel und dem Gehirne wurde je 1,0 gr herausgeschnitten, um die Bestimmung des Glykogens, des wirklichen und hydrolysierbaren Zuckers vorzunehmen. Die Materialien wurden schnell gewogen, um dann in eine Lösung von Kalilauge (30 g/dl) gegossen zu werden, indem man das Verfahren von Yamamoto weiterbenutzt.

III. VERSUCHSERGEBNISSE.

*A. Blutzuckerspiegel bei der normalen Taube.**a) Blutzuckerspiegel des gesamten Blutes.*

Es handelte sich um 16 normale Tauben, bei denen der Zuckerspiegel (Gesamtreduktionswert, der wirkliche Zucker, der Restreduktionswert und der freie hydrolysierbare Zucker) analysiert wurde. Die daraus sich ergebenden Resultate zeigt Tabelle I.

TABELLE I.

Resultate der an 16 Tauben ausgeführten Versuche
(Durchschnittswerte)

Körpergewicht (g)	Gesamtreduk- tionswert (mg%)	Restreduk- tionswert (mg%)	Wirklicher Zuckerwert (mg%)	Freier hydrolys. Zuckerwert (mg%)
287	252	69	183	52

Bei den Tauben waren die Werte der Zuckerfaktoren im Blute, insbesondere der Restreduktionswert und der freie, hydrolysierbare Zuckerwert, höher als bei Kaninchen bzw. Menschen.

Wenn es auf den freien, hydrolysierbaren Zucker ankommt, so erzielte man ihm dadurch, dass von dem nach der Orzin-Methode im Blut erhaltenen Zuckerwerte der unter Verwendung von Hefe bestimmte Zuckerwert abgezogen wurde, und zwar stimmt dieser Wert mit dem des Polysaccharides bzw. Disaccharides, welches im Blut nicht reduzierbar vorhanden ist, überein. Da aber der Restreduktionswert im Blut der normalen Tauben verhältnismässig höher ist, so entstehen nicht unwesentliche Unterschiede zwischen dem aus den bisherigen Untersuchungen erzielten Zuckerwert (Gesamtreduktionswert) und dem wirklichen Zuckerwert. Der Kohlehydratstoffwechsel bei B-Avitaminosen, insoweit er den obengenannten Gesamtreduktionswert zum Merkmal hat, muss einer neuen Untersuchung unterworfen werden, bei der der wirkliche Zuckergehalt ein Merkmal bildet.

b) *Der Zuckerspiegel im Blutplasma der normalen Tauben.*

Wie Tabelle II zeigt, betragen die Durchschnittswerte des im Blutplasma von 11 Tauben sich findenden (gebundenen oder hydrolysierbaren) Zuckergehaltes 105 mg%, was sich gegenüber den Werten bei anderen Tieren niedriger zeigt (nach Yamamoto), obwohl sich der Orzinzuckergehalt in enteiweisster Flüssigkeit bei der erheblichen Höhe von 352 mg% fand.

TABELLE II.
Resultate der an 11 Tauben ausgeführten Versuche.
(Durchschnittswerte)

Körpergewicht (g)	Gesamtkohle- hydrat im Blutplasma. (mg%)	Orzinzucker- wert in enteiweisster Flüssigkeit (mg%)	Gebundener hydrolys. Zuckerwert (mg%)
258	457	352	105

B. *Der Blutzuckerspiegel bei B-avitaminösen und hungernden Tauben.*

Wurden die Tauben mit B-vitaminfreier Nahrung (mit Wasser und Salzmischung gemischtem geschältem Reis) zwangsweise gefüttert, so kamen bei den Tieren, binnen wenigstens 14 Tagen und höchstens 18 Tagen, Krämpfe vor. Während dieser Fütterung wurde den Tieren in Abständen von 2 oder 4 Tage Blut entnommen, um den Zuckerspiegel im Gesamtblut bzw. im Blutplasma zu untersuchen. Die daraus sich ergebenden Resultate zeigt Tabelle III.

Der wirkliche Zuckergehalt im Blut hat sich im Anfangsstadium der Fütterung in seinem Wert entweder nicht verändert oder in sehr leichtem Grade gesenkt, während er einige Tage vor den Krampfanfällen mässig anstieg. In diesem Stadium stieg auch der Restreduktionswert etwas höher. Da der bisher bei B-avitaminösen Tauben beobachtete Gesamtreduktionswert die Summe des wirklichen Zuckers und des Reduktionswertes ist, kann man

TABELLE III (A).

Der Zuckerspiegel im Gesamtblut bei B-avitaminösen Tauben.

Nr.	Datum	Fütterungs- tage mit B-Vitamin- freier Diät	Körper- gewicht (g)	Gesamt- reduktions- wert (mg%)	Restreduk- tionswert (mg%)	Wirklicher Zuckerwert (Reduktion) (mg%)	Orin- zuckerwert in entweißter Flüssigkeit (mg%)	Freier hydrolys. Zuckerwert (mg%)
1	25/II	vor	253	233	61	172	222	50
	27	2	253	224	52	170	220	50
	1/III	4	250	225	57	175	234	59
	4	7	242	238	60	180	253	73
	8	11	237	249	66	187	267	80
	11	14	233	270	72	198	300	102
	(Krampf)							
2	25/II	vor	265	242	61	181	243	62
	27	2	261	239	61	178	241	63
	1/III	4	256	240	60	180	246	66
	4	8	250	248	64	184	254	70
	8	12	243	260	62	198	281	83
	12	15	240	272	70	202	300	98
	(Krampf)							
3	14/III	vor	292	270	63	207	264	47
	16	2	290	275	60	215	260	45
	19	5	286	272	61	211	263	52
	22	8	283	273	66	207	277	70
	26	12	277	294	70	224	300	76
	29	15	270	311	73	238	334	96
	(Krampf)							
4	14/III	vor	235	261	54	207	258	51
	16	2	230	250	50	200	249	49
	19	5	230	248	52	196	249	53
	23	9	223	269	59	210	270	60
	27	13	216	290	66	224	303	79
	30	16	210	305	71	234	315	81
	31	17	208	316	71	245	334	89
(Krampf)								

	2/IV	vor	295	276	63	213	253	40
	4	2	293	242	60	182	210	28
	7	5	290	241	61	180	216	36
	9	7	288	240	50	190	231	41
5	11	9	284	268	53	215	262	47
	14	12	280	280	58	222	273	51
	17	15	275	292	66	226	268	42
	19	17	271	310	68	242	280	38
	20	18	271	326	76	250	312	62
	(Krampf)							

TABELLE III (B).

Der Zuckerspiegel im Blutplasma bei B-avitaminösen Tauben.

Nr.	Datum	Fütterungs-tage mit B-Vitamin-freier Diät	Körper-gewicht (g)	Gesamt-kohlehydrat (mg%)	Orcin-zuckerwert in entfeiweisster Flüssigkeit (mg%)	Gebundener hydrolys. Zuckerwert (mg%)
	2/III	vor	259	419	317	102
	4	2	259	403	325	78
	7	5	258	415	345	70
	9	7	255	420	351	69
1	11	9	253	417	354	63
	14	12	250	426	360	66
	16	14	247	430	372	58
	18	16	240	437	387	50
	(Krampf)					
	2/VII	vor	288	412	311	101
	4	2	285	407	310	97
	7	5	283	417	333	84
	9	7	280	416	338	78
2	11	9	276	423	345	78
	14	12	275	413	340	73
	17	15	269	420	353	67
	19	17	266	429	370	59
	20	18	262	438	381	57
	(Krampf)					

	21/VII	vor	220	511	403	108
3	24	3	218	502	411	91
	27	6	212	524	443	81
	30	9	207	526	444	82
	2/VIII	12	200	538	463	75
	5	15	198	561	491	70
	7	17	194	598	536	62
	(Krampf)					
4	21/VII	vor	287	469	385	84
	23	2	284	451	385	66
	26	5	278	473	411	62
	29	8	272	480	417	63
	1/VIII	11	269	497	436	61
	4	14	262	512	454	58
	6	16	257	525	468	57
	8	18	255	556	510	46
5	(Krampf)					
	10/VIII	vor	262	442	329	113
	13	3	261	431	333	98
	16	6	254	455	364	91
	20	10	248	467	380	87
	23	13	244	472	388	84
	26	16	241	480	402	78
	30	20	235	493	422	71
	1/XI	22	233	498	437	61
6	(Krampf)					
	2/IX	vor	305	431	333	98
	4	2	305	425	342	83
	6	4	298	421	344	77
	9	7	292	439	361	78
	12	10	286	445	380	65
	15	13	283	451	399	52
	19	17	278	474	425	49
	(Krampf)					

beim tatsächlichen Zuckergehalt bei B-avitaminösen Tauben nicht so deutliche Zunahme erkennen, wie sie beim Gesamtreduktionswert bei B-Avitaminosen beobachtet worden ist. Dagegen zeigt aber der freie, hydrolysierbare Zucker im Blut bei B-Avitaminosen eine ziemlich deutliche Zunahme. Nach diesem Resultat kann man sich leicht vorstellen, dass im Blut der B-Avitaminose-Taube eine Vermehrung des nicht reduzierbaren Zuckers stattfindet, der unabhängig von der Glykose vorhanden ist.

Aber der an Eiweiss gebundene, hydrolysierbare Zucker im Blutplasma zeigt bei der B-avitaminösen Fütterung eine allmähliche Abnahme, welche einige Tage vor den Krampfanfällen noch deutlicher wird.

Bei hungernden Tauben zeigt der wirkliche Zucker im Blut im Anfangsstadium des Hungers entweder keine Veränderung oder eine sehr kleine Abnahme. Einige Tage vor dem Hungertod begann er aber plötzlich sich beträchtlich zu vernehmen. Dagegen nehmen der an Eiweiss gebundene, hydrolysierbare Zucker wie bei B-Avitaminosen mit dem Hunger stufenweise ab, bis er sich kurz vor dem Hungertod um die Hälfte herabsetzt.

TABELLE IV (A).

Der Zuckerspiegel im Gesamtblut bei hungernden Tauben.

Nr.	Datum	Hungers- tage	Körper- gewicht (g)	Gesamt- kohlehydrat (mg%)	Bestreuthk- tionswert (mg%)	Wirklicher Zuckerwert (Reduktion)	Orcin- zuckerwert in enteiweißter Flüssigkeit (mg%)	Freier hydrolys. Zuckerwert (mg%)
1	14/I	vor	260	235	73	162	223	61
	16	2	254	216	67	149	247	98
	17	3	254	233	62	171	257	86
	18	4	250	239	68	171	266	95
	19	5	245	255	72	183	275	92
	20	6	237	285	74	211	313	102
	21	7	229	312	81	231	341	110
	23	9	222	414	94	301	398	97
	24	Tod.						

	14/I	vor	323	220	69	151	208	57
	16	2	318	215	72	143	221	78
	17	3	310	228	71	157	240	83
2	18	4	298	249	76	173	250	77
	19	5	296	246	72	174	251	77
	20	6	290	286	83	223	300	77
	21	7	287	398	91	287	377	90
	22	Tod.						
	26/I	vor	265	249	76	173	226	53
	28	2	254	231	69	162	247	65
	29	2	253	234	71	163	249	86
	30	4	250	227	67	160	264	104
	31	5	248	248	73	175	282	107
3	1/II	6	241	259	73	186	301	115
	2	7	241	270	79	191	310	119
	4	9	232	287	80	207	350	143
	5	10	226	296	85	211	366	155
	6	11	224	409	92	317	395	78
	7	12	220	422	99	323	412	89
	8	Tod.						
	8/II	vor	324	242	68	174	213	37
	10	2	317	232	65	167	221	54
	12	4	300	250	67	183	240	57
	14	6	285	262	68	194	249	55
4	15	7	275	268	64	204	268	64
	16	8	261	280	71	209	285	76
	18	10	250	305	73	232	304	72
	19	11	242	321	72	249	339	90
	20	12	240	356	80	276	352	76
	21	Tod.						
	8/II	vor	285	220	82	138	203	65
	10	2	270	220	84	136	214	78
	12	4	251	211	80	131	225	94
5	13	5	243	234	84	150	247	97
	14	6	232	261	88	173	263	90
	15	7	220	280	90	190	280	90
	16	8	216	313	93	220	319	99
	17	Tod.						

TABELLE IV (B).

Der Zuckerspiegel im Blutplasma bei hungernden Tauben.

Nr.	Datum	Hungerstage	Körpergewicht (g)	Gesamt-Kohlehydrat (mg%)	Orcinzuckerwert in enteiweißter Flüssigkeit (mg%)	Gebundener hydrol. Zuckerwert. (mg%)
1	25/V	vor	330	456	368	88
	26	1	327	458	390	68
	27	2	320	471	429	42
	29	4	310	480	440	40
	30	5	290	496	459	37
	31	Tod.				
2	25/V	vor	316	430	326	104
	26	1	310	444	346	98
	28	3	303	458	375	83
	30	5	292	465	388	77
	1/VI	7	286	480	421	59
	2	8	275	491	440	51
	3	Tod.				
3	5/VI	vor	268	468	366	102
	6	1	264	460	358	102
	9	3	251	480	396	84
	11	5	240	518	447	71
	13	7	221	548	495	53
	14	Tod.				
4	28/VI	vor	285	445	347	98
	20	2	279	442	352	90
	22	4	278	456	382	74
	24	6	274	466	415	51
	26	8	266	475	425	50
	28	10	245	500	468	32
	29	Tod.				
5	18/VI	vor	286	481	374	107
	20	2	274	488	383	105
	22	4	268	494	398	96
	24	6	262	498	404	94
	26	8	257	511	424	87
	28	10	239	533	461	72
	30	Tod.				

Wenn man einmal den Zuckerspiegel im Gesamtblut oder im Blutplasma bei B-Avitaminosen und beim Hunger vergleicht, so ergeben sich die Durchschnittswerte, welche Tabelle V zeigt. Bezuglich der Unterschiede des Blutzuckerwertes bei B-Avitaminosen und bei hungernden Tieren zeigten sie sich nur beim wirklichen Zuckerwert deutlich. Der wirkliche Zuckerwert im Blut nahm bei beiden Fällen zu; was bei den hungernden Tauben besonders deutlich bemerkbar war; also stieg der Wert um 76,3%

TABELLE V (A).

Vergleich der Zuckerkwerte im Gesamtblut vor der Fütterung mit B-Vitamin-freier Diät und bei Krampfanfällen.
(Durchschnittswerte bei 6 Fällen)

	Körpergewicht (g)	Wirklicher Zuckerwert (Reduktion) (mg%)	Freier hydrolys. Zuckerwert (mg%)
Vor der Fütterung mit B-vitaminfreier Diät	268,0	196,0	50,0
Endstadium (Krampfanfall)	244,4	226,6	89,4
Zunahme oder Abnahme (%)	-8,7	+15,6	+78,8

TABELLE V (B).

Vergleich der Zuckerkwerte im Gesamtblut in Anfang- und
Endstadium des Hungers.
(Durchschnittswerte bei 6 Fällen)

	Körpergewicht (g)	Wirklicher Zuckerwert (Reduktion) (mg%)	Freier hydrolys. Zuckerwert (mg%)
Anfangsstadium	291,4	159,6	54,6
Endstadium	237,0	281,4	90,2
Zunahme oder Abnahme (%)	-18,6	+76,3	+65,2

bei hungernde Tauben, während er bei B-avitamiösen Tauben nur um 15,6% gegen den Anfangswert zunahm. Auch beim Körpergewicht betrug der Wert der Abnahme bei hungernden Tauben 18,6%, dagegen bei B-avitaminösen Tauben nur 8,7%.

C. Der Einfluss der Einspritzung von B-Vitaminen oder B₁-Vitaminen auf den Blutzuckerspiegel bei B- oder B₁-Avitaminosen.

Bei den mit B-Vitamin oder B₁-vitaminfreier Nahrung zwangsläufig ernährten Tauben wurde ein Blutzuckerspiegel beobachtet, dessen Werte, wie sie sich bei Krampfanfällen bei Tieren ergaben, verglichen wurden.

Betreffs der Massregel gegen die Krampfanfälle wurden allerdings 0,3 ccm „Paranutrin“, ein Präparat vom Vitaminkomplex und 0,1 ccm „Betaxin“, ein Präparat vom B₁-Vitamin, den Tieren injiziert, um eine Erleichterung der Anfälle zu erzielen. Indem die Versuchstiere von da ab mit derselben Nahrung gefüttert wurden, bekamen sie täglich 0,3 ccm Paranutrin oder 0,1 ccm Betaxin injiziert, damit sich der Zuckerspiegel des Gesamtblutes (Gesamtreduktionsweits und wirklichen Zuckerwerts) allmählich demjenigen Wert (Anfangswert) nähert, den die Tiere vor der Fütterung mit B₁-vitaminfreier Nahrung besessen. Dabei wurde beobachtet, in wie viel Tagen nach den Krampfanfällen der Blutzuckerspiegel zum Anfangswert zurückkehren konnte.

Tabelle VI(A) zeigt die Veränderungen des Blutzuckerspiegels sowie des Körpergewichtes bei B-avitaminösen Tauben, welche bei B₁-avitaminösen Tauben in Tabelle VI (B) dargeboten sind.

Hiermit werden die Tage, die die Versuchstiere in zur Wiederkehr des Anfangsstadium ihres Zuckerspiegels nötig hatten, bei B-Avitaminosen und B₁-Avitaminosen verglichen. Daraus ergaben sich die Durchschnittswerte, welche bei den ersten 13,4 Tage und bei den letzteren 9,4 Tage betrugen. Betreffs der Veränderungen des Körpergewichts nahmen die Tiere bei B-Avitaminosen 36 g und bei B₁-Avitaminosen 26,4 g ab, bis bei ihnen die Krampfanfälle auftraten.

TABELLE VI (A).

Verschiedene Zuckerwerte im Gesamtblut von Tauben in einfacher
B-Avitaminose und nach den Krampfanfällen bei Behandlung
mit B-oder Bi-Vitaminpräparat.

Nr.	Datum	Fütterungs-tage mit Bi-vitamin-freier Diät	Körper-gewicht (g)	Gesamt-reduktions-wert (mg%)	Wirklicher Zuckerwert (Reduktion) (mg%)	Oreinzucker-wert in entweißter Flüssigkeit (mg%)	Freier hydrolys. Zuckerwert (mg%)	
1 (Krampf)	3/IV	vor	297	251	177	240	63	
	16	13	270	270	186	263	77	
	23	20	262	283	201	303	102	
	von 23/IV injiz. Betaxin 0.1 cem täglich.							
	26/IV	3	252	273	190	279	89	
	30	7	236	270	181	251	70	
	4/V	11	264	243	163	235	72	
	3/IV	vor	350	239	167	226	59	
	16	13	338	261	181	265	84	
	22	19	320	272	190	288	98	
2 (Krampf)	von 22/IV injiz. Paranutrin 0.3 cem täglich.							
	25/IV	3	323	249	172	250	78	
	29	7	329	257	177	248	71	
	3/V	11	337	246	170	235	65	
	5/V	vor	283	261	196	250	54	
	15	10	260	280	211	293	82	
	21	16	252	317	237	335	98	
	3 (Krampf)	von 21/V injiz. Betaxin 0.1 cem täglich.						
	24	3	250	290	217	302	85	
	28	7	256	280	213	283	70	
4 (Krampf)	2/VI	12	265	267	200	247	47	
	5/V	vor	273	245	185	249	64	
	15	10	248	286	216	297	81	
	26	21	230	315	234	331	97	
	von 26/V injiz. Paranutrin 0.33 cem täglich.							
	29	3	235	278	206	277	71	
	2/VI	7	248	259	192	271	79	
	5	10	250	258	194	264	70	
	9	14	253	244	179	247	68	

	4/VI	vor	317	288	216	299	83
15	11		295	330	260	362	102
24	20		277	370	284	400	119
(Krampf)							
5	von 24/VI injiz. Betaxin 0,1 cem täglich.						
	28/VI	4	272	311	241	341	100
	1/VII	7	270	316	248	350	102
	4	10	274	300	226	323	97
	8	14	280	295	220	319	99
	13	19	283	280	223	307	84

TABELLE VI (B).

Verschiedene Zuckerwerte im Gesamtblut von Tauben in B₁-Avitaminose und nach den Krampfanfällen bei Behandlung mit B-oder B₁-Vitaminpräparat.

Nr.	Datum	Fütterungs-tage mit B-xitamin-freier Diät	Körper-gewicht (g)	Gesamt-reduktions-wert (mg%)	Winklicher Zuckerwert (Reduktion) (mg%)	Orcinzucker-wert in entweißter Flüssigkeit (mg%)	Freier hydrolys.-Zuckerwert (mg%)
	7/II	vor	324	252	189	266	77
1	12	12	320	275	211	301	90
	19	19	314	290	226	321	95
	27	27	300	323	248	368	120
1	(Krampf)						
	von 27/II injiz. Betaxin 0,1 cem täglich.						
	1/III	2	297	271	203	326	123
	4	5	294	290	224	347	123
	7	8	299	248	193	313	120
	7/II	vor	252	231	170	240	70
2	12	5	251	249	186	269	83
	19	12	247	280	212	297	85
	28	21	226	299	227	324	97
2	(Krampf)						
	von 28/II injiz. Paranutrin 0,3 cem täglich.						
	3/III	3	228	261	196	280	84
	7	7	233	237	175	254	79

	15/II	vor	268	250	183	222	59
	21	6	254	244	183	220	37
	27	12	246	257	194	260	66
	4/III	18	234	275	205	294	89
	9	23	219	302	223	321	98
3	(Krampf)	von 9/III injiez. Betaxin 0,1 cem täglich.					
	12/III	2	216	262	198	275	77
	15	5	220	271	207	273	66
	18	8	222	253	188	238	50
	21	11	225	252	180	228	48
	24/III	vor	321	248	177	247	70
	29	5	315	247	173	245	72
	9/IV	16	299	300	218	340	122
4	(Krampf)	von 9/IV injiz. Betaxin 0,1 cem täglich.					
	12/IV	3	276	266	197	285	88
	16	7	285	253	179	259	80
	24/III	vor	306	223	155	221	66
	30	6	304	245	178	258	80
	10/IV	17	295	279	201	300	99
	(Krampf)	von 10/IV injiz. Paranutrin 0,3 cem täglich.					
5	13/IV	3	272	259	182	270	88
	17	7	276	254	179	264	85
	21	11	283	244	168	247	79
	24	14	291	228	158	224	71

Während einerseits den Versuchstieren nach den Krampfanfällen Paranutrin oder Betaxin injiziert worden sind, so wurde anderseits bei ihnen die Zunahme des Körpergewichtes beobachtet. So ergab sich, dass das Körpergewicht bei dem Stadium, bei dem der Blutzuckerwert zu seinem Anfangswert zurückkehrte, sowohl bei B-Avitaminosen als auch bei B₁-Avitaminosen nur in geringem Grade (bei der erstenen 40%, bei der letzteren 37%) wiederkehrte.

Ferner habe ich bei den B-avitaminösen Tauben und bei den

B_1 -avitaminösen Tauben die Zunahme des Blutzuckerwertes (der Restreduktion, des wirklichen Zuckers und des freien hydrolysierbaren Zuckers) verglichen, um damit die Durchschnittswerte zu erzielen, welche in Tabelle VII gezeigt werden.

TABELLE VII (A).

Zunahme des Blutzuckerwertes von Tauben in B -Avitaminose.
(Durchschnittswerte bei 5 Tauben)

Gesamtred.- wert (mg%)	Restreduk- tionswert (mg%)	Wirkl. Zuckerwert (Reduktion) (mg%)	Orcinzucker- wert in entei- weisster Flüssigkeit (mg%)	Freier hydrolys. Zuckerwert (mg%)
59	14	45	79	36

TABELLE VII (B).

Zunahme des Blutzuckerwertes von Tauben in B_1 -Avitaminose.
(Durchschnittswerte bei 5 Tauben)

Gesamtred.- wert (mg%)	Restreduk- tionswert (mg%)	Wirkl. Zuckerwert (Reduktion) (mg%)	Orcinzucker- wert in entei- weisster Flüssigkeit (mg%)	Freier hydrolys. Zuckerwert (mg%)
60	11	49	86	46

Weiter wurden den hungernden Tauben am 5. oder 6. Tage nach dem Hungerversuch täglich 0,3 ccm Paramutrin oder 0,1 ccm Betaxin injiziert, um die Einflüsse dieser Injektionen auf den Blutzuckerspiegel zu beobachten. Wie Tabelle VIII zeigt, sind dabei sowohl bei B-Vitaminkomplex als auch bei B_1 -Vitamin Präparat keine Einflüsse zu spüren.

TABELLE VIII.

Verschiedene Zuckerwerte im Gesamtblut der hungernden Tauben und Behandlungsresultate mit B- oder B₁-Vitaminpräparat.

Nr.	Datum	Hungerstage	Gesamt-reduktionswert (mg%)	Rest-reduktionswert (mg%)	Wirkl.-Zuckerwert (mg%)	Orein-zuckerwert in enteiweißter Flüssigkeit (mg%)	Körpergewicht (g)
1	24/IV	vor	247	80	168	242	269
	29	5	259	83	176	286	252
	von 29/IV injiz. Paranutrin 0,3 eem täglich						
	1/V	7	290	90	200	336	238
	3	9	301	94	207	375	230
2	4	Tod					
	24/IV	vor	255	73	182	229	290
	30	6	307	79	228	320	260
	von 30/V injiz. Betaxin 0,1 eem täglich						
	2/V	8	338	91	247	388	251
3	4	Tod					
	6/V	vor	277	69	208	263	340
	12	6	295	69	225	292	223
	von 12/V injiz. Betaxin 0,1 eem täglich						
	14	8	306	74	232	365	216
4	16	10	403	87	316	385	211
	17	Tod					
	6/V	vor	282	65	217	257	315
	12	6	333	72	261	325	270
	von 12/V injiz. Paranutrin 0,3 eem täglich						
4	15	9	435	87	348	380	261
	17	Tod					

D. Die Zuckerbilder der Organe und des Gewebes bei hungernden und B-avitaminösen Tauben.

Es handelt sich um die hungernden und B-avitaminösen Tauben, bei denen bei der Leber, beim Muskel und beim Gehirn Zuckerbilder verglichen wurden. Die daraus erzielten Resultate

zeigt Tabelle IX.

Die Zuckerbilder der Leber, des Muskels und des Gehirns bei normalen Tauben. (Mittelwerte bei 6 Tauben)

TABELLE IX (A).

Die Zuckerbilder der Leber, des Muskels und des Gehirns

bei normalen Tauben.

(Mittelwerte bei 6 Tauben)

	Gesamt-kohle-hydrat (mg%)	Gesamt-hydrol. Zucker (mg%)	Freier Zucker (mg%)	Glykogen (mg%)	Gebunde- ner hydroloys. Zucker- wert (mg%)	Orzinzucker- wert in ent- eweisster Flüssigkeit im Blut (mg%)
Leber	4609	3043	1566	2566	477	
Muskel	1280	1052	228	718	334	226
Gehirn	712	548	164	248	300	

Die Zuckerbilder der Leber, des Muskels und des Gehirns bei B-avitaminösen Tauben. (Mittelwerte bei 5 Tauben)

TABELLE IX (B)

Die Zuckerbilder der Leber, des Muskels und des Gehirns

bei B-avitaminösen Tauben.

(Mittelwerte bei 5 Tauben)

	Gesamt-kohle-hydrat (mg%)	Gesamt-hydrol. Zucker (mg%)	Freier Zucker (mg%)	Glykogen (mg%)	Gebunde- ner hydroloys. Zucker- wert (mg%)	Orzinzucker- wert in ent- eweisster Flüssigkeit im Blut (mg%)
Leber	3304	2147	1157	1646	501	vor 239
Muskel	1105	922	183	506	416	Bei Krampfan- fällen 316
Gehirn	660	520	140	221	299	

Die Zuckerbilder der Leber, des Muskels und des Gehirns bei hungernden Tauben. (Mittelwerte bei 6 Tauben)

TABELLE IX (C).

Die Zuckerbilder der Leber, des Muskels und des Gehirns
hungernder Tauben.

(Mittelwerte bei 6 Tauben)

	Gesamt-kohle-hydrat (mg%)	Gesamt-hydrol. Zucker (mg%)	Freier Zucker (mg%)	Glykogen (mg%)	Gebunde-n ner hydroloys. Zucker- wert (mg%)	Orzinzucker- wert in ent- eiweisster Flüssigkeit im Blut (mg%)
Leber	1132	707	425	195	512	vor dem Hunger 237
Muskel	792	653	139	205	448	Endstadium des Hungers
Gehirn	567	439	128	114	325	364

Wie Tabelle IX zeigt, kann man beim Vergleich der Zuckerbilder bei hungernden und B-avitaminösen Tauben bei der Leber eine deutliche Verschiedenheit erkennen. Betreffs der Abnahme des Gesamtkohlehydratgehaltes ergab sich bei hungernden Tauben 75,5%, dagegen bei B-avitaminösen Tauben nur 28,3. Weiter ergab die Abnahme beim Muskel bei hungernden Tauben 38%, bei B-avitaminösen Tauben nur 10%. Beim Gehirn betrug sie bei hungernden Tauben 20%, während bei B-avitaminösen Tauben nur 8%. Bei der Abnahme der einzelnen Zuckerkomponenten erkannte man bei der Leber den deutlichsten Unterschied, bei dem der freie Zucker (Glykose) und Glykogen bei den hungernden Tauben ganz beträchtliche Abnahme zeigten. Der Muskel nahm dann an Glykogengehalt bei den hungernden Tauben ab, was uns ziemlich deutlich auffiel. Die Werte bei gebundenem Zucker bei Leber und Gehirn zeigten sowohl bei hungernden als auch bei B-avitaminösen Tauben keine wesentlichen Veränderungen gegen normale Tauben.

IV. ZUSAMMENFASSUNG.

1. Beim Blutzuckerspiegel bei normalen Tauben, im Gegensatz zu dem bei Kaninchen, nahmen sowohl der Gesamtreduktionswert

als auch der wirkliche Zuckerwert zu; der Restreduktionswert und der freie hydrolysierbare Zuckerwert zeigten eine beträchtliche Zunahme.

2. Beim Vergleich des Blutzuckerspiegels nahm der wirkliche Zuckerwert im Blut bei den B-avitaminösen wie bei den hungrigen Tauben zu, was bei dem letzteren Falle besonders auffallend war, indem der Zuwachs dabei 76% höher als der Anfangswert war, während er beim ersten Falle nur 16% betrug. Die anderen Zuckerwerte im Blut (Restreduktionswert, der freie hydrolysierbare Zucker und an Eiweiss gebundener Zucker) liessen nicht wesentliche Schwankungen erkennen in der Weise, dass der freie hydrolysierbare Zucker in erster Linie, dann der Restreduktionswert je in geringem Grade zunahmen, dagegen der letztere beträchtlich abnahm.

3. Um zu erklären, welcher Faktor vom B-Vitamine bei der Kohlehydratstoffwechselstörung die Hauptrolle spielt, haben wir mit den B-Avitaminösen und den B₁-Avitaminösen einerseits den Zuckerspiegel im Blut verglichen, anderseits die Regulierung des Kohlehydratstoffwechsels beobachtet, welche sich bei der Einspritzung von B- oder B₁-Vitaminen gegen die Krampfanfälle zeigte. Damit war ersichtlich, dass keine besonderen Verschiedenheiten am Blutzuckerspiegel bei den B- und B₁-Avitaminösen zu spüren waren und dabei dieser abnorme Kohlehydratstoffwechsel durch die Verabreichung von B-Vitamin-Präparaten gut reguliert werden konnte.

4. Der Versuch, bei dem beobachtet wurde, in wieviel Tagen die Störungen vom Zuckerhaushalt durch die Einspritzungen von „Paranutrin“ oder „Betaxin“ beseitigt werden konnten, (die Einspritzungen wurden beim Krampfanfalle an B- oder B₁-avitaminösen Tauben vorgenommen), ergab bei B-Avitaminösen 13; B₁-Avitaminösen 9 Tage.

5. Die Störungen im Zuckerhaushalt beim Krampfanfalle können zwar mit der Verabreichung von B- oder B₁-Vitaminen kontrolliert werden, aber das Körpergewicht kehrte dabei nur geringen Grades zum Anfangswert zurück.

6. Die Kohlehydratstoffwechselstörungen bei den hungrigen Tauben sind mit dem B- oder B₁-Vitamin-Präparate niemals zu

regulieren.

7. Mit diesen Resultaten kann man feststellen, dass die Kohlehydratstoffwechselstörungen durch die Abwesenheit vom B₁-Vitamin im B-Vitaminkomplex hervorgerufen werden und die Regulierungsfunktion des Kohlehydratstoffwechsels bei B-Avitaminosen der Wirkung des B₁-Vitamins zuzuschreiben und zwar ist sie bei B-Avitaminosen spezifisch.

8. Betreffs der Zuckerbilder der Leber, des Muskels und des Gehirns gibt es bei hungernden und B-avitaminösen Tauben grosse Verschiedenheiten. Besonders ist es bei der Leber auffallend, weil die Abnahme des Gesamtkohlehydratgehalts bei der Leber bei hungernden Tauben 75,5%, dagegen bei B-Avitaminösen 28,3% ausmacht.

Bei der einzelnen Zuckerkomponente zeigen sich freier Zucker und Glykogen in der Leber bei hungernden Tauben als bei B-Avitaminösen beträchtlich vermindert, was uns besonders auffiel.

LITERATUR.

- Abderhalden (1923): Arch. f. d. ges. physiol., **198**, 169.
- Ariyama (1933): Nippon Nogeikagaku Zassi, **9**.
- Bickel (1938): Schweiz. med. Wschr., **99**.
- Bickel u. Collazo (1923): Deutsch. med. Wochenschr., Nr. 45.
- Collazo (1922): Biochem. Zeitschr., **134**, 194.
- Collazo u. Morelli (1923): Biochem. Zeitschr., **136**, 20.
- Collazo u. Pi-Suner-Bayo (1931): Biochem. Zeitschr., **238**, 335.
- Collazo u. Pi-Suner-Bayo (1932): Biochem. Zeitschr., **250**, 89.
- Collip (1923): J. of biol. chem., **56**, 513; **57**, 65.
- Doi (1932): J. of Biochem., **15**.
- Drigalski (1935): Arch. Verdgskrkh., **57**, 1.
- Funk u. Schoenborn (1914): J. of physiol., **48**, 328.
- Glaser u. Halpern (1929): Biochem. Zeitschr., **207**, 377.
- Gottschalk (1924): Deutsch. med. Wochenschr., Nr. 1.
- Gutmann u. Kallfelz (1929): Klin. Wschr., **2246**.
- Hirai (1921): Nippon Biorigakkai Zassi, **11**.
- Hosoda (1933): Nippon Naikagakkai Zassi, **15**.
- Hosokawa (1924): J. of Biochem., **4**, 2.
- Jones u. Sure (1937): J. amer. med. Assoc., **109**, 706.
- Lajos (1936): Biochem. Zeitschr., **284**, 280.
- Nakamura (1936): Tokio Igakukai Zassi, **50**, 11.
- Ogata (1920): Nissin Igaku, **10**.

- Okamoto (1931): Kioto Furitū Ikadaigaku Zassi, **5**, 1.
Oshima, Takahashi u. Murakami (1938): Jikken Shokakibyogaku,
13.
Parade (1938): Klin. Wschr. 1938, **510**.
Rosenwald u. Negri (1926): Biochem. Zeitschr., **168**, 324.
Rubino u. Collazo (1923): Biochem. Zeitschr., **140**, 252.
Schroeder (1940): Muensch. med. Wschr., **847**.
Strauss (1938): J. amer. med. assoc., **110**, 953.
Tanaka (1932): Osaka Igakkai Zassi, **31**, 3.
Tislowitz (1937): Klin. Wschr., Nr. 7.
Winter u. Smith (1925): J. of physiol., **61**, 5.
Wirkins (1937): Arch. int. Med., **45**, 1.
Yamamoto (1940): J. of Biochem., **32**, 161 & 389.



ÜBER EINEN INHIBITOR DER GLYOXALASE.

VON

KIYOMATU ISIMOTO.

(*Aus dem biochemischen Institut der medizinischen Fakultät Niigata.
Direktor: Prof. Dr. N. Ariyama.*)

(Eingegangen am 30. November 1941)

Pankreas enthält nach Dakin und Dudley (1913) eine Substanz, die die Wirkung der Glyoxalase hemmt, die die Glyoxale (z. B. Methylglyoxal) in die ihnen entsprechenden Oxysäuren (z. B. Milchsäure) umwandelt. Die Feststellung, dass diese Substanz ihrer Natur nach fermentlich ist, veranlasste sie, dieser Substanz den Namen Antiglyoxalase zu geben. Späterhin wurde von anderen Autoren bewiesen, dass Antiglyoxalase auch in der Niere vorkommt [Platt & Schroeder (1934); Woodward, Munro & Schroeder (1935); Nagaya, Yamazoye & Nakamura (1936); Purr (1938)].

Wie bekannt, bedarf Glyoxalase als Koferment Glutathion. Nach Nagaya, Yamazoye und Nakamura (1936) und Yamazoye (1936) ist der Wirkungsmechanismus der Glyoxalase folgender: Zuerst katalysiert das Ferment die Verbindung zwischen Glutathion und dem Substrat Methylglyoxal, dann wirkt es weiter auf diese Verbindungssubstanz ein und spaltet sie auf in Milchsäure und Glutathion. Der Wirkungsmechanismus der in der Niere befindlichen Antiglyoxalase ist nach Nagaya, Yamazoye und Nakamura (1936) folgender: Diese Antiglyoxalase wirkt auf Glutathion ein und spaltet es auf. Daraus bildet sich eine Substanz, die positive Cystein-Reaktion ergibt. Dieses Reaktionsprodukt verbindet sich mit Methylglyoxal, und zwar mit derselben Geschwindigkeit wie Glutathion. Glyoxalase aber vermag auf diese Verbindungssubstanz nicht mehr einzuwirken. So hemmt also die Antiglyoxalase die Wirkung der Glyoxalase dadurch, dass sie das Koferment von Glyoxalase, Glutathion aufspaltet. Nach Purr

(1938) soll das Wesen der Antiglyoxalase von Pankreas und Niere eine Iminopolypeptidase sein.

Nach Foster und Woodrow (1924), Foster (1925), Ariyama (1928) und Sakuma (1930) befindet sich im Pankreas ausserdem noch ein anderer Inhibitor der Glyoxalase, der eine grosse Hitzebeständigkeit aufweist, und daher nicht-fermentlich sein kann. Um die chemischen Eigenschaften dieses Inhibitors der Glyoxalase einmal klar zu stellen, habe ich nun eine Reihe von Versuchen gemacht, deren Ergebnisse in dem hier folgenden Bericht niedergelegt sind.

I. UNTERSUCHUNGSMETHODE ZUR FESTSTELLUNG DER HEMMENDEN WIRKUNG DES INHIBITORS DER GLYOXALASE.

Das Trockenpräparat der Kaninchenleber, das nach dem Verfahren von Sakuma (1930) hergestellt wurde, diente als Ferment. Die Wirksamkeit dieses Leberpulvers als Glyoxalase veränderte sich mehrere Jahre hindurch kaum, wenn man es im Exsiccator über Schwefelsäure aufbewahrte. Um die Fermentlösung herzustellen, wurden 15 bis 20 cem Wasser pro 1 g zum Leberpulver hinzugesetzt, bei 37°C aufbewahrt, von Zeit zu Zeit geschüttelt, und nach Ablauf einer Stunde filtriert.

Der Versuch, eine hemmende Wirkung irgendeiner Substanz auf Glyoxalase zu erwirken, wurde folgendermassen ausgeführt: In einen 50 cem-Messkolben wurden 5 cem der Fermentlösung, ein bestimmtes Volumen der Lösung der zu untersuchenden Substanz (Inhibitor der Glyoxalase) und 2 cem der 0,1*M* Methylglyoxalösung (14,4 mg) hineingegeben, der Kolben mit Borsäure-Borax-Pufferlösung (pH 7,0) bis zu 50 cem gefüllt. Dieser Ansatz wurde dann bei 37°C aufbewahrt und von Zeit zu Zeit Proben zur Bestimmung der Menge des jeweils übriggebliebenen Methylglyoxals entnommen. Dazu bediente man sich der kolorimetrischen Methode von Ariyama (1928). Beim Kontrollversuch wurde an Stelle der Lösung der zu untersuchenden Substanz die gleiche Menge Wasser gebraucht.

Da die hemmende Wirkung der antiglyoxalatischen Substanz

sich durch den Kontakt dieser Substanz mit Glyoxalase im Verhältnis zur Länge der Inkubationszeit vermehrt, und bei zweistündigem Kontakt im allgemeinen fast maximal hervortritt, pflegte man fast immer, antiglyoxalatische Wirkung bei zweistündigem Kontakt der zu untersuchenden Substanz mit Glyoxalase in Anwesenheit von Borsäure-Borax-Pufferlösung (P_H 7.0) zu untersuchen. In den folgenden Experimenten sind die Ergebnisse über die hemmende Wirkung des Inhibitors der Glyoxalase, wenn nicht anders gesagt, immer nur bei zweistündigem Kontakt dargestellt.

II. DER IN GEWEBEN DURCH AUTOLYSE ENTSTANDENE INHIBITOR DER GLYOXALASE.

Zur Ausführung der Versuche wurde käufliches Pankreatin-Präparat gewählt, da diese Substanz mit Pankreas verwandtschaftliche Beziehung hat, und auf seine antiglyoxalatische Wirkung geprüft. Dabei stellte sich heraus, dass die Wirksamkeit des Pankreatins als Antiglyoxalase von dem Grade des Alters abhing. Ältere Präparate waren in ihren antiglyoxalatischen Wirkungen immer viel stärker als die neueren. Der Grund dafür schien zu sein, dass im Laufe der Veraltung im Pankreatin wahrscheinlich eine antiglyoxalatisch wirksame Substanz, und zwar durch eine autolyse-ähnliche Abartung entstehe. Um diese näher festzustellen, wurde folgender Versuch gemacht. Eine 10%ige Emulsion von neuem Pankreatin (Präparat nach Pharmacopoeia Japonica) wurde hergestellt, ein wenig Toluol hinzugesetzt und bei 37°C 48 Stunden lang aufbewahrt. Nach Ablauf dieser Zeit wurde wieder eine 10%ige Emulsion vom Pankreatin frisch hergestellt, und beide Präparate, nämlich das aufbewahrte und das frisch hergestellte, wurden filtriert, je 2,5 ccm der Filtrate wurden inbezug auf ihre antiglyoxalatische Wirksamkeit verglichen. Das Resultat dieses Versuches zeigt Tabelle I. Das bei 37°C 48 Stunden lang aufbewahrte Pankreatin zeigte tatsächlich, wie erwartet, stärkere Wirksamkeit als das andere.

Mittels weiterer Versuche wurde festgestellt, dass die antiglyoxalatische Wirksamkeit des Pankreatins sich durch Dialyse sehr bedeutend verminderte, sich aber durch Erhitzung auf 130°C

TABELLE I.
Antiglyoxalatische Wirksamkeit des frischen und des
autolyzierten Paukreatins.

- A. 2,5 ecm des Filtrates der bei 37°C 48 Stunden lang aufbewahrten 10%igen Emulsion des Pankreasins + 5 ecm Glyoxalaselösung + 35 ecm Borsäure-Borax-Pufferlösung (PH 7,0).
 B. 2,5 ecm des Filtrates von frisch herstellter 10%iger Emulsion des Pankreasins; andere Bedingungen wie bei A.

Kontrolle. 2,5 ccm Wasser an Stelle des Filtrates vom Pankreatin; andere Bedingungen wie bei A.

Jeder Ansatz bei 37°C 2 Stunden lang aufbewahrt, 2 ccm 0,1 M Methylglyoxal-lösung (14,4 mg) hinzugefügt, mit Pufferlösung bis zu 50 ccm gefüllt, bei 37°C aufbewahrt, Proben zur Bestimmung der jeweils übriggebliebenen Menge von Methylglyoxal entnommen.

Zeit (Min.)	A		B		Kontroll.	
	Methylglyoxal-Verbrauch					
	mg	%	mg	%	mg	%
15	0,8	5,8	1,2	8,5	9,3	64,5
30	1,6	11,0	2,2	15,5	14,4	100,0
45	2,0	14,0	2,9	20,0		
60	2,4	16,5	3,5	24,3		
90	3,2	22,0	4,4	30,5 ¹		

TABELLE II.
Autolysenzeit und antiglyoxalatische Wirksamkeit des Autolysates
von Schweinepankreas

Schweinepankreas + 3 fache Menge Wasser + ein wenig Toluol, bei 37°C aufbewahrt. Proben auf 100°C 30 Minuten lang erhitzt, filtriert. Je 5 ccm der Filtrate für die Untersuchung gebraucht.

2 Stunden lang zum grössten Teile hielt. Diese Feststellung berechtigte zur Schlussfolgerung, dass im Pankreatin außer der Antiglyoxalase noch ein Inhibitor von nicht grossem Molekulargewicht vorhanden sein müsse.

Um nun zu erfahren, ob im Pankreasgewebe selbst durch Autolyse auch ein Inhibitor der Glyoxalase gebildet werde, wurde folgendes Experiment gemacht. Es wurde eine Emulsion von Schweinepankreas mit einer 3 fachen Menge Wasser hergestellt, ein wenig Toluol hinzugesetzt, dann das Ganze bei 37°C aufbewahrt und so autolysiert. Von Zeit zu Zeit wurden der Emulsion Proben entnommen, die auf 100°C 30 Minuten lang erhitzt und dann filtriert wurden. Je 5 ccm der Filtrate wurden auf ihre antiglyoxalatische Wirkung untersucht. Tabelle II zeigt das Resultat dieses Versuches. Wir sehen, dass das Pankreas seine antiglyoxalatische Wirkung im Verhältnis zur Länge der Autolysenzeit progressiv erhöhte; mit anderen Worten, im Pankreas entstand durch Autolyse ein Inhibitor der Glyoxalase, der sich im gleichen Masse zur Autolysenzeit vermehrte.

Um weiter zu erfahren, ob es nicht nur dem Pankreas, sondern auch anderen verschiedenen Geweben möglich sei, durch Autolyse einen Inhibitor der Glyoxalase zu bilden, wurde folgender Versuch gemacht. Es wurde je eine Emulsion von Muskel, Gehirn, Knochen (ein harter Knochenteil mit Knochenmark), Niere und Leber eines Kaninchens mit einer 4 fachen Menge Wasser hergestellt, ein wenig Toluol hinzugesetzt, bei 37°C aufbewahrt und so autolysiert. Nach 48 stündiger Aufbewahrung wurden diese Emulsionen auf 100°C 30 Minuten lang erhitzt und dann filtriert. Je 5 ccm der Filtrate wurden auf ihre antiglyoxalatische Wirksamkeit geprüft. Das Resultat dieses Versuches zeigt Tabelle III. Man sieht, dass jedes Gewebe antiglyoxalatische Wirksamkeit erzielte, und was den Grad der Intensität der Wirksamkeit angeht, in der hier aufgezeichneten Reihenfolge: Niere, Leber, Gehirn, Knochen, Muskel; bei Niere und Leber war die Wirksamkeit besonders stark. Leber enthält in frischem Zustande bekanntlich Koferment für Glyoxalase; daher fördert frische Leber die Wirkung der Glyoxalase. Im obigen Falle jedoch trat die gegenteilige Wirkung ein d. h. die Leber

TABELLE III.

Antiglyoxalatische Wirksamkeit der Autolysate von verschiedenen Geweben des Kaninchens.

Jedes Gewebe + 4 fache Menge Wasser + ein wenig Toluol, 37°C 48 Stunden, 100°C 30 Minuten, filtriert. Je 5 ccm der Filtrate für die Untersuchung gebraucht.

Zeit (Min.)	Methylglyoxal-Verbrauch											
	Kontroll.		Muskel		Knochen		Gehirn		Leber		Niere	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
15	9,1	63,0	6,8	47,0	5,2	36,5	4,1	28,5	1,8	12,5	1,2	8,5
30	14,4	100,0	13,2	91,5	10,2	70,8	7,8	54,5	3,4	23,8	2,4	17,0
45			14,4	100,0	14,4	100,0	11,3	78,2	4,8	33,2	3,7	25,5
60							14,4	100,0	6,0	42,2	4,7	32,5
90									8,2	57,0	6,3	44,0

TABELLE IV.

Autolysenzeit und antiglyoxalatische Wirksamkeit des Autolysates von Kaninchenleber.

Untersuchungsmethode und Bedingungen die gleichen wie beim Versuch von Tabelle II.

Zeit (Min.)	Kontroll.	Autolysenzeit (St.)										
		0	1	2	3	4	5,5					
	Methylglyoxal-Verbrauch											
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
10	—	—	10,2	70,0	—	—	—	—	—	—	—	—
15	11,5	80,0	14,4	100,0	4,9	41,3	2,0	14,0	1,9	13,3	1,2	8,7
30	14,4	100,0			10,5	73,0	3,8	26,5	3,5	24,3	2,3	16,0
45					14,4	100,0	5,3	37,0	4,9	34,2	3,3	23,3
60							6,8	46,8	6,2	43,2	4,4	30,5
90							9,2	64,0	8,6	60,0	6,3	43,8

hemmte die Wirkung der Glyoxalase, wenn man sie autolysieren liess, und zwar aus dem Grunde, weil sich dabei ein Inhibitor der Glyoxalase bildete.

Es sei hier noch ein Bericht beigefügt über einen anderen

Versuch, der inbezug auf den Inhibitor der Leber gemacht wurde. Es wurde eine Emulsion von Kaninchenleber mit einer 3 fachen Menge Wasser hergestellt, ein wenig Toluol hinzugesetzt und bei 37°C aufbewahrt. Von Zeit zu Zeit wurden der Emulsion Proben entnommen, die auf 100°C 30 Minuten lang erhitzt und dann filtriert wurden. Je 5 ccm der Filtrate wurden auf ihre antiglyoxalatische Wirkung untersucht. Das Resultat dieser Untersuchung zeigt Tabelle IV. Leber erzielte demnach, im Gegensatz zum Pankreas, schon in relativ kurzer Autolysezeit eine sehr stark antiglyoxalatische Wirksamkeit. Bei diesem Versuche wurde schon bei 4 stündiger Autolyse ein Maximum erreicht.

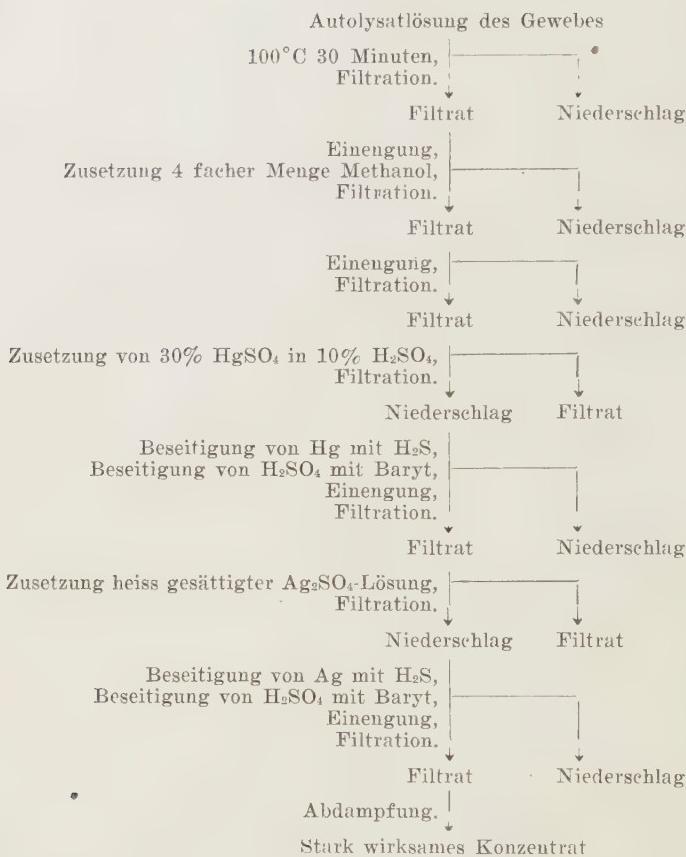
Ein weiterer Versuch ergab, dass frische Kaninchenniere und frische Kaninchenleber, wenn man sie im Autoklav auf 130°C 2 Stunden lang erhitzte, auch eine ähnlich stark antiglyoxalatische Wirksamkeit erzielten wie bei Autolyse.

So entstand also ein Inhibitor der Glyoxalase, wenn verschiedene Gewebe durch Autolyse oder Autoklavierung aufgespalten wurden. Das dürfte bedeuten, dass für die Entstehung des Inhibitors die Aufspaltung der Gewebe sicher notwendig war.

III. REINIGUNG DES DURCH AUTOLYSE ENTSTANDENEN INHIBITORS DER GLYOXALASE.

Um ein stark wirksames Konzentrat des durch Autolyse entstandenen Inhibitors der Glyoxalase zu erzielen, ferner, um ihn, wenn möglich, rein zu isolieren, wurde eine Reihe mühevoller Versuche gemacht, deren erster Fall zu einem vollen Erfolge führte; insofern nämlich ein Konzentrat der Substanz zustande kam, das bei Prüfung mit einer relativ sehr kleinen Menge eine sehr stark antiglyoxalatische Wirkung zeigte. Die Autolysate von Leber, Niere und Pankreatin wurden nach dem im folgenden Schema aufgezeichneten Verfahren behandelt.

Um zuerst einen Niederschlag von Eiweiss aus der Autolysatlösung des Gewebes zu erzielen, wurde die Lösung auf 100°C 30 Minuten lang erhitzt, und durch darauffolgende Filtration die hitzeaggregierbare Substanz beseitigt. Die antiglyoxalatische Substanz ging dabei gar nicht in das Koagulat über. Die Mutter-



lösung wurde dann durch Eindampfen eingeengt. Als Äthanol dieser Lösung hinzugesetzt wurde, drang ziemlich viel antiglyoxalatische Substanz in den dadurch entstandenen Niederschlag ein. Daher wurde die Behandlung mit Äthanol aufgegeben. Bei einem Versuch mit Methanol ging fast gar keine wirksame Substanz in den damit erhaltenen Niederschlag über. Daher wurde der durch Zusatz von 4 facher Menge Methanol entstandene Niederschlag beseitigt. Dann wurde Methanol aus der Mutterlösung durch Eindampfen beseitigt, und die Lösung weiter eingeengt. Während der Einengung entstand ein antiglyoxalatisch nicht

wirksamer Niederschlag, der ebenfalls durch Abfiltrieren beseitigt wurde. Dann wurde der Mutterlösung eine 30%ige Quecksilbersulfatlösung, die durch Auflösen dieser Substanz in 10%ige Schwefelsäurelösung hergestellt wurde, hinzugesetzt. Dadurch entstand ein Niederschlag, in dem sehr viel antiglyoxalatische Substanz enthalten war. In der Mutterlösung blieb zwar noch etwas von der wirksamen Substanz zurück, man vernachlässigte sie jedoch. Der Niederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff aufgespalten, und der dabei entstandene Niederschlag von Quecksilbersulfid durch Abfiltrieren beseitigt. Dann wurde die in der Lösung vorhandene Schwefelsäure mit Baryt vorsichtig d. h. unter Vermeidung übermässigen Zusatzes von Baryt beseitigt. Die Lösung wurde dann eingeengt. Während der Einengung entstand ein nicht wirksamer Niederschlag, der abfiltriert wurde. Durch Abdampfung der Mutterlösung erhielt man ein Konzentrat, das beim Versuch mit einer immerhin kleinen Menge eine sehr stark antiglyoxalatische Wirkung auslöste. Tabelle V zeigt die antiglyoxalatische Wirksamkeit von je 20 mg der Konzentrate, die aus den Autolysaten von Schweineniere, Schweineleber und Pankreatin-Präparat bei dieser Zwischenstufe des Reinigungsverfahrens entstanden. Das aus der Niere gewonnene Konzentrat war demnach

TABELLE V.

Antiglyoxalatische Wirksamkeit von je 20 mg der Konzentrate, gewonnen aus verschiedenen Autolysaten durch Fällung mit Quecksilbersulfat.

Zeit (Min.)	Schweine- niere		Schweine- leber		Pankreatin		Kontroll.	
	Methylglyoxal-Verbrauch							
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
15	0,3	2,5	1,1	7,5	1,8	12,3	8,6	6,0
30	0,6	4,5	2,0	14,0	3,7	25,5	14,4	100,0
45	0,9	6,4	2,9	20,0	5,3	36,5		
60	1,1	7,5	3,7	26,0	6,8	47,3		
90	1,4	9,7	5,2	36,2	9,2	64,0		

TABELLE VI.

Antiglyoxalatische Wirksamkeit des Konzentrates, gewonnen aus dem
Autolysat von Schweineniere durch Fällung
mit Silbersulfat.

Zeit (Min.)	Kontroll.	Gebrauchte Menge des Konzentrates (mg)					
		5	10	15			
	Methylglyoxal-Verbrauch						
		mg	%	mg	%	mg	%
15		8,5	59,0	2,0	14,8	1,2	9,0
30		14,4	100,0	4,0	27,9	2,2	15,5
45				5,9	41,0	2,8	20,2
60				7,3	51,0	3,3	23,4
90				9,9	68,5	3,8	27,0
						1,3	9,0

in der antiglyoxalatischen Wirksamkeit am stärksten.

Als man der Lösung des Konzentrates, das mittels Fällung durch Quecksilbersulfat gewonnen worden war, eine heiss gesättigte Lösung von Silbersulfat hinzusetzte, entstand ein Niederschlag. Dieser Niederschlag wurde mit Schwefelwasserstoff aufgespalten, und der dabei entstandene Silbersulfidniederschlag durch Abfiltrierung beseitigt. Dann wurde die in der Lösung vorhandene Schwefelsäure vorsichtig mit Baryt beseitigt. Die Mutterlösung wurde dann eingeengt. Während der Einengung entstand ein antiglyoxalatisch nicht wirksamer Niederschlag, der durch Abfiltrierung beseitigt wurde. Durch Abdampfung der Mutterlösung gelang es, ein Konzentrat zu gewinnen, das beim Versuch mit noch kleinerer Menge eine sehr stark antiglyoxalatische Wirkung zeigte. Die Wirksamkeit von 5, 10 und 15 mg des Konzentrates, das aus dem Autolysat von Schweineniere bei dieser letzten Stufe des Reinigungsverfahrens gewonnen wurde, zeigt Tabelle VI. Dieses Konzentrat war bräunlich und hygroskopisch. Wenn man es in Wasser auflöste, entwickelte sich eine hellgelbe Lösung, welche grüne Fluoreszenz ergab. Dieses Konzentrat war als Inhibitor der Glyoxalase zwar sehr stark wirksam, der Inhibitor jedoch noch nicht ganz rein isoliert.

So war es also nicht möglich, die reine Isolierung zu erzielen. Die nächsten im folgenden hier aufgezeichneten Versuche nun gingen darauf hinaus, das Wesen des in den Geweben durch Autolyse entstandenen Inhibitors der Glyoxalase von anderen Seiten her zu beleuchten.

IV. ANTIGLYOXALATISCHE WIRKUNG DER SPALTPRODUKTE VON EIWEISSSTOFFEN MITTELS TRYPSIN.

Da es wahrscheinlich war, dass der durch Autolyse in verschiedenen Geweben entstehende Inhibitor der Glyoxalase sich eventuell durch Aufspaltung des Eiweisses der Gewebe bilden könnte, liess man zunächst Trypsin auf möglichst reines Eiweiss einwirken, und das so gewonnene Spaltprodukt des Eiweisses wurde auf seine antiglyoxalatische Wirkung untersucht, und zwar wie folgt. Zu je 8 g von Casein, Fibrin, Serumalbumin, Eieralbumin und Witte-Pepton wurden 100 cem der 0,25%igen Natriumcarbonatlösung, 0,4 g Trypsin-Präparat und ein wenig Toluol hinzugegeben, die Präparate bei 37°C 4 Tage lang aufbewahrt, dann auf 100°C 30 Minuten lang erhitzt und filtriert. Je 5 cem

TABELLE VII.

Antiglyoxalatische Wirksamkeit der Spaltprodukte der verschiedenen Eiweissstoffe mittels Trypsin.

Je 8 g der Eiweissstoffe + 0,4 g Trypsin-Präparat + 100 cem 0,25%ige Na₂CO₃-lösung, 37°C 4 Tage, 100°C 30 Minuten. Je 5 cem der Filtrate von diesen Präparaten für die Untersuchung gebraucht.

Zeit (Min.)	Kontroll,		Casein		Serum- albumin		Eier- albumin		Fibrin		Witte- Pepton	
	Méthylglyoxal-Verbrauch											
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
15	8,6	58,5	6,3	42,0	5,9	38,8	5,6	36,5	2,5	17,3	1,5	10,5
30	14,4	100,0	11,8	81,0	10,7	73,5	9,9	67,9	5,0	32,5	2,8	19,2
45			14,4	100,0	14,4	100,0	14,4	100,0	6,8	45,5	3,8	26,5
60									8,3	56,0	5,0	32,2
90									10,9	74,5	6,2	41,0

der Filtrate wurden auf ihre antiglyoxalatische Wirkung untersucht. Das Resultat dieses Versuches zeigt Tabelle VII. Alle Spaltprodukte zeigten demnach antiglyoxalatische Wirksamkeit. Was den Grad der Wirksamkeit angeht, so sieht man, dass die Spaltprodukte von Casein, Serumalbumin und Eieralbumin doch relativ nicht so starke Wirkung hervorriefen, während die Wirkung der Spaltprodukte von Fibrin und Witte-Pepton sehr stark war. Aus obigem Versuche wurde geschlossen, dass in den reinen Eiweissstoffen der verschiedenen Arten, wenn man sie mit Trypsin behandelte, sich ein Inhibitor der Glyoxalase bildete.

Eine Ausnahme bildete Witte-Pepton, insofern als dieser Eiweissstoff antiglyoxalatische Wirkung zeigte, auch ohne Behandlung mit Trypsin; mit anderen Worten, Witte-Pepton war schon an sich, und zwar mindestens in dem Grade aufgespalten, als es für die Aufweisung der antiglyoxalatischen Wirksamkeit notwendig war. Es wurde nun versucht, experimentell einen Vergleich herzustellen zwischen dem Grade der antiglyoxalatischen Wirksamkeit des mit Trypsin behandelten Witte-Peptons und dem Grade der antiglyoxalatischen Wirksamkeit des mit Trypsin nicht be-

TABELLE VIII.
Trypsinbehandlung des Witte-Peptons.

- A. 8 g Witte-Pepton + 100 ccm Wasser. 5 ccm dieser Lösung für die Untersuchung gebraucht.
- B. 8 g Witte-Pepton + 0,4 g Trypsin-Präparat + 100 ccm 0,25%ige Na_2CO_3 -lösung + ein wenig Toluol, 37°C 4 Tage, dann 100°C 30 Minuten. 5 ccm des Filtrates von diesem Präparat für die Untersuchung gebraucht.

Zeit (Min.)	Kontroll.		A		B	
	Methylglyoxal-Verbrauch					
	mg	%	mg	%	mg	%
15	8,5	59,0	2,0	14,0	1,4	10,0
30	14,4	100,0	3,3	23,0	2,7	19,0
45			4,8	31,2	3,7	25,9
60			5,6	36,9	4,9	31,7
90			7,2	48,0	6,2	41,0

handelten Witte-Peptons. Wie Tabelle VIII zeigt, war die Wirksamkeit im erstenen Falle tatsächlich etwas stärker als im zweiten Falle.

V. ANTIGLYOXALATISCHE WIRKUNG DER TOTALHYDROLYSATE VON EIWEISSSTOFFEN MITTELS SCHWEFELSÄURE.

Ein nächster Versuch ging darauf hinaus, zu konstatieren, ob auch ein aus möglichst reinem Eiweiss mittels Schwefelsäure hergestelltes Totalhydrolysat antiglyoxalatische Wirkung zeige. Die Totalhydrolyse des Eiweißes geschah nach Kossel und Kutscher (1900). In jeden der Kolben wurden je 10 g von Casein, Eieralbumin und Witte-Pepton mit 60 ccm Wasser und 30 g Schwefelsäure gegeben. Dann wurde jeder Kolben mit einem Rückflusskühler versehen, auf ein Sandbad gesetzt, der Inhalt 15 Stunden lang gekocht, dann gekühlt und Schwefelsäure mit Baryt beseitigt. Durch Eindampfen wurde das Volumen jeder dieser Lösungen auf 100 ccm gebracht. Je 2 ccm dieser Lösungen wurden auf ihre antiglyoxalatische Wirksamkeit untersucht. Tabelle IX zeigt das Resultat dieses Versuches. Jedes Eiweiss erzielte dem-

TABELLE IX.

Antiglyoxalatische Wirksamkeit der Totalhydrolysate von verschiedenen Eiweissstoffen mittels Schwefelsäure.

Je 10 g der Eiweissstoffe + 60 ccm Wasser + 30 g Schwefelsäure, 15 Stunden lang gekocht, mit Baryt neutralisiert, filtriert, das Volumen jeder dieser Filtrate auf 100 ccm gebracht. Je 2 ccm dieser Lösungen für die Untersuchung gebraucht.

Zeit (Min.)	Kontroll.		Casein		Witte-Pepton		Eieralbumin	
	Methylglyoxal-Verbrauch							
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
15	8,5	58,9	3,5	22,5	0,8	5,9	0,6	4,5
30	14,4	100,0	6,5	43,8	1,3	9,0	1,1	7,4
45			9,1	63,0	1,8	12,5	1,5	10,3
60			11,4	79,0	2,2	15,4	1,8	12,5
90			14,4	100,0	2,8	19,5	2,2	15,4

nach antiglyoxalatische Wirksamkeit durch Totalhydrolyse mittels Schwefelsäure. Was den Grad der antiglyoxalatischen Wirksamkeit angeht, war dieselbe beim Hydrolysat von Casein verhältnismässig schwach, bei den Hydrolysaten von Witte-Pepton und Eieralbumin jedoch auffallend stark. Das will heissen, ein Inhibitor der Glyoxalase entstand aus verschiedenen reinen Eiweissstoffen durch Hydrolyse, und diese Substanz wurde durch Schwefelsäure nicht zerstört.

VI. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE ANTIGLYOXALATISCHE WIRKUNG DER AMINOSÄUREN.

Da, wie oben beschrieben, Autolysate der verschiedenen Gewebe, Spaltprodukte von reinen Eiweissstoffen mittels Trypsin und Totalhydrolysate von reinen Eiweissstoffen mittels Schwefelsäure alle antiglyoxalatische Wirkung aufwiesen, so durfte man mit Recht annehmen, dass das Wesen des Inhibitors der Glyoxalase in den Bauelementen des Eiweisses d. h. in den verschiedenen Aminosäuren zu suchen war. Deshalb wurden verschiedene Aminosäuren auf ihre antiglyoxalatische Wirkung untersucht. Zur Untersuchung wurden je 50 mg verschiedener Aminosäuren verwandt (in Wasser aufgelöst, und, wo nötig, neutralisiert). Das Resultat dieser Untersuchung ist in Tabelle X niedergelegt. Tryptophan, Histidin, Glutaminsäure und Leucin zeigten demnach fast gar keine antiglyoxalatische Wirksamkeit, Arginin schien sogar, ganz im Gegenteil, die Wirkung der Glyoxalase etwas zu

TABELLE X.

Antiglyoxalatische Wirkung der Aminosäuren (zu je 50 mg).

Zeit (Min.)	Kontroll.	Arginin		Leucin		Tryptophan		Histidin		Glutaminsäure	
		mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
15	7,8	54,2		9,1	63,0	7,1	49,0	6,6	45,9	6,4	44,5
30	14,4	100,0		14,4	100,0	13,0	90,5	12,2	84,8	11,8	81,9
45						14,4	100,0	14,4	100,0	14,4	100,0

fördern.

Es wurden nun auch Glycyl-glycin und Leucyl-glycyl-glycin untersucht; beide Substanzen zeigten keine antiglyoxalatische Wirksamkeit.

Girsavicius und seine Mitarbeiter (1934, 1935) berichteten, dass sie bei Histidin antiglyoxalatische Wirkung beobachtet hätten. Sie nahmen an, Histidin sei das Wesen der Antiglyoxalase des Pankreas. In einem späteren Berichte (1936) behaupteten sie, dass ausser Histidin auch Arginin, Tyrosin und Asparaginsäure in geringem Grade und Tryptophan und Glutaminsäure im hohen Grade antiglyoxalatische Wirksamkeit ausgelöst hätten. Da jedoch die Untersuchungsmethode von Girsavicius und seiner Mitarbeiter nicht geeignet, sogar fehlerhaft war, so kann man ihren Berichten kein rechtes Vertrauen entgegenbringen. Schroeder, Munro und Weil (1935), welche die Untersuchungen von Girsavicius und seiner Mitarbeiter über Histidin nachprüften, konnten antiglyoxalatische Wirksamkeit dieser Aminosäuren nicht nachweisen. Das gleiche Resultate wurde auch hier erzielt, wie oben bereits beschrieben, nicht nur bei Histidin, sondern auch bei Tryptophan, Glutaminsäure und Arginin. Genauer gesagt, Tryptophan, Histidin, Glutaminsäure etc. zeigten, wie aus Tabelle X ersichtlich ist, äusserst wenig hemmende Wirkung auf Glyoxalase; ja der Grad dieser Hemmung war so gering, dass im Vergleich zur Wirkung des Inhibitors der Glyoxalase sie tatsächlich gar nicht in Frage kam.

Der Grund dafür, dass Arginin im Gegensatz zur Ansicht von Girsavicius und seiner Mitarbeiter die Wirkung der Glyoxalase etwas förderte, lag, wie aus folgendem Versuch ersichtlich ist, in der Wirkung des Arginins, insofern es bei der Inkubation mit Methylglyoxal im Laufe der Kontaktzeit unmittelbar auf Methylglyoxal einwirkt und es verschwinden lässt. Das Resultat des Kontaktversuches des Arginins mit Methylglyoxal zeigt Tabelle XI. Methylglyoxal verschwand demnach progressiv im Laufe der Inkubation mit Arginin. Da bei diesem Versuche neutralisiertes Arginin mit Methylglyoxal bei Verwendung von Borsäure-Borax-Pufferlösung ($\text{pH } 7,0$) in Kontakt gesetzt wurde, und da die

TABELLE XI.
Wirkung des Arginins auf Methylglyoxal.

4 ccm *d*-Argininlösung (150 mg, neutralisiert) + 2 ccm 0,1 *M* Methylglyoxallösung (14,4 mg), mit Borsäure-Borax-Pufferlösung (PH 7,0) bis zu 50 ccm gefüllt, bei 37°C aufbewahrt.

Zeit (Min.)	15	30	45	60	90	120	150	
Methylgly- oxal- Verbrauch	mg %	3,9 26,7	6,2 42,9	7,9 54,9	9,1 63,2	10,6 73,7	11,6 80,5	12,2 84,7

Tatsache, dass die Amino-Gruppe sich unmittelbar mit Methylglyoxal verbindet, bereits von vielen Autoren [Neuberg & Kobel (1927), Sakuma (1930), Watanabe (1933), Kisch (1933) und Kobayasi (1938)] festgestellt worden ist, muss man annehmen, dass der Grund für diese Wirkung des Arginins nicht in der basischen Eigenschaft des Arginins lag, sondern in der unmittelbaren Reaktion der zwei Amino-Gruppen des Arginins auf Methylglyoxal.

Trotz seiner Schwerlöslichkeit wurde ein Versuch mit Cystin gemacht. Als Cystin in 1/20*N* Natronlauge gelöst und diese Lösung neutralisiert wurde, schied Cystin nicht aus, sondern blieb im gelösten Zustande. Tabelle XII, die das Resultat der Untersuchung dieser Lösung von Cystin auf ihre antiglyoxalatische

TABELLE XII.
Antiglyoxalatische Wirksamkeit des Cystins.

Zeit (Min.)	Kontroll.	Gebrauchte Menge des Cystins (mg)							
		1		2		3			
		mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
15	8,5	59,0		3,1	22,0	2,4	12,0	0,8	6,5
30	14,4	100,0		5,7	39,5	3,0	21,5	1,7	12,3
45				7,6	52,6	4,0	28,3	2,3	16,5
60				9,2	64,2	4,8	33,2	2,7	19,2
90				11,5	80,0	5,8	40,0	3,2	22,5

Wirksamkeit darstellt, zeigt, dass selbst eine so geringe Menge Cystin von nur 2 bis 3 mg eine erstaunlich stark antiglyoxalatische Wirksamkeit hervorbringen konnte. Cystein aber blieb ohne jede antiglyoxalatische Wirkung.

So zeigte also von allen hier untersuchten Aminosäuren nur Cystin allein antiglyoxalatische Wirkung, alle anderen waren unwirksam.

VII. ANTIGLYOXALATISCHE WIRKUNG DER DIE DISULFID-GRUPPE ENTHALTENDEN SUBSTANZEN.

Die Entdeckung, dass Cystin einen hohen Grad der antiglyoxalatischen Wirksamkeit auslöste, gab Anlass, auch andere verschiedene Disulfidverbindungen auf ihre antiglyoxalatische Wirksamkeit zu untersuchen.

Es wurde mit Dithiodiglykolsäure begonnen. Die Darstellung der Dithiodiglykolsäure geschah nach der Methode von Claesson (1881). Zur Untersuchung wurde Dithiodiglykolsäure in Wasser aufgelöst, und vorsichtig und genau mit Natronlauge neutralisiert. Diese genau neutralisierte Dithiodiglykolsäurelösung wurde nun auf ihre antiglyoxalatische Wirksamkeit untersucht. Das Resultat dieses Versuches zeigt Tabelle XIII. Danach war Dithiodiglykol-

TABELLE XIII.
Antiglyoxalatische Wirksamkeit der Dithiodiglykolsäure.

Zeit (Min.)	Kontroll.		Gebrauchte Menge der Dithiodiglykolsäure (mg)					
			8,3		16,7		25,0	
	Methylglyoxal-Verbrauch							
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
15	11,1	77,0	1,9	13,1	1,1	7,5	0,7	5,0
30	14,4	100,0	3,6	24,9	1,8	12,8	1,3	8,8
45			5,2	36,0	2,7	18,6	1,7	11,8
60			6,4	44,7	3,4	23,7	2,0	13,9
90			9,0	62,2	4,9	33,8	2,7	18,5

säure in der antiglyoxalatischen Wirksamkeit zwar etwas schwächer als Cystin, immerhin aber noch ziemlich stark.

Als Nächstes wurde Aneurindisulfid untersucht. Die Darstellung des Aneurindisulfids erfolgte nach der Methode von Zima, Ritsert und Moll (1941). Zur Aneurinlösung wurde ein wenig Wasserstoffsuperoxyd hinzugesetzt und die Reaktion der Lösung zu pH 7,5 reguliert. Diese Lösung wurde dann bei 37°C 24 Stunden lang aufbewahrt. Als Resultat daraus ergab sich die Oxydation des Aneurins zu Aneurindisulfid. Aus dieser Lösung wurde Wasserstoffsuperoxyd durch Luftzufuhr beseitigt. Diese wasserstoffsuperoxydfreie Aneurindisulfidlösung wurde nun auf ihre antiglyoxalatische Wirksamkeit untersucht. Die Folge war, dass, wie Tabelle XIV zeigt, während 10 mg Aneurin fast gar keine

TABELLE XIV.

Antiglyoxalatische Wirksamkeit des Aneurindisulfids.

- A. 10 mg Aneurin.
- B. Aus 10 mg Aneurin gewonnenes Aneurindisulfid.
- C. Mittels H₂S erhaltenes Reduktionsprodukt des aus 10 mg Aneurin gewonnenen Aneurindisulfids.

Zeit (Min.)	Kontroll.		A		B		C	
	Methylglyoxal-Verbrauch							
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
15	10,3	71,4	8,6	60,0	0,9	6,0	5,1	35,2
30	14,4	100,0	14,4	100,0	1,5	10,2	10,0	69,5
45					1,9	13,3	14,4	100,0
60					2,3	16,2		
90					2,9	20,0		

antiglyoxalatische Wirksamkeit auslöste, das aus 10 mg Aneurin gewonnene Aneurindisulfid sehr starke Hemmungswirkung gegenüber Glyoxalase aufwies. Als man nun Aneurindisulfid mittels Schwefelwasserstoff reduzierte, verschwand die antiglyoxalatische Wirksamkeit fast vollständig.

Oxydiertes Glutathion ist zwar auch eine Disulfidverbindung, bei der Untersuchung dieser Substanz jedoch konnte man keine

antiglyoxalatische Wirksamkeit beobachten. Zieht man hier nun die Tatsache in Betracht, dass reduziertes Glutathion das Koferment der Glyoxalase ist, so ist es nicht unverständlich, von dem oxydierten Glutathion keine antiglyoxalatische Wirksamkeit erwarten zu können, weil es wenigstens zum Teil leicht in die reduzierte Form übergehen kann.

Da also verschiedene Disulfidverbindungen mit Ausnahme von oxydiertem Glutathion antiglyoxalatische Wirksamkeit zeigten, so liegt der Schluss nahe, dass das Wesen des in den Geweben durch Autolyse entstandenen Inhibitors der Glyoxalase höchstwahrscheinlich im Cystin oder in einer dem Cystin ähnlichen Disulfidverbindung bestehe.

VIII. DER SCHWEFEL IN DEN AUS AUTOLYSATEN VON GEWEBEN GEWONNENEN ANTIGLYOXALATISCH WIRKSAMEN KONZENTRATEN.

Bei der Prüfung des antiglyoxalatisch stark wirksamen Konzentrates, gewonnen aus dem Autolysat der Niere, auf die verschiedenen Eiweissfarbenreaktionen ergab sich, dass nur die Ninhydrin-Reaktion und die Bleisulfid-Reaktion positiv waren. Daraus folgte, dass dieses Konzentrat eine Aminosäure oder eine ihr verwandte Verbindung enthielt, und zudem auch Schwefel in organischem Zustande. Beim Konzentrationsversuch wurde die Tatsache festgestellt, dass der organische Schwefel in enger Beziehung zur antiglyoxalatischen Wirksamkeit stand. Der organische Schwefel im antiglyoxalatisch wirksamen Konzentrat war durch Alkalisieren der Lösung leicht aufspaltbar, und wenn aufgespalten, verschwand gleichzeitig die antiglyoxalatische Wirksamkeit. Es wurde daraus geschlossen, dass der organische Schwefel mit dem Wesen des in den Geweben durch Autolyse entstandenen Inhibitors der Glyoxalase eng verwandt war. Daher musste die Alkalisierung der Lösung der antiglyoxalatischen Substanz immer möglichst vermieden werden, besonders beim Konzentrieren.

Beim Titrationsversuch mit Jod nahm das antiglyoxalatisch wirksame Konzentrat von Niere nur ein wenig, nachdem man es

aber mit Cyanat reduziert hatte, sehr viel Jod auf. Ferner, während bei diesem Konzentrat die Nitroprussid-Natrium-Reaktion negativ war, wurde dieselbe Reaktion nach Reduktion mit Schwefelwasserstoff positiv. Das Reduktionsprodukt des antiglyoxalatisch wirksamen Konzentrates, das positive Nitroprussid-Natrium-Reaktion ergab, war bei auch nur äusserst schwachem Alkalisieren immerhin leicht reoxydierbar. Daraus ersieht man, dass dieses antiglyoxalatisch wirksame Konzentrat eine Art Disulfidverbindung enthielt.

Da ferner das antiglyoxalatisch wirksame Konzentrat von Niere nach Reduktion auf die für Cystein spezifische Reaktion nach Hunter und Eagles (1927) positiv reagierte, darf man ebenfalls mit Recht annehmen, dass dieses Konzentrat Cystin oder eine dem Cystin ähnliche Substanz enthielt. Dann wurde der Gehalt des organischen Schwefels in diesem antiglyoxalatisch wirksamen Konzentrat bestimmt, indem man den darin enthaltenen organischen Schwefel oxydierte und in Benzidinsulfat umwandelte. Vorausgesetzt, dass diese ganze Schwefelmenge als Cystin darin enthalten war, so ergab sich bei der Berechnung der Menge ein Cystingehalt von 25,7%. Wenn man einen Vergleich zwischen dem Grade der

TABELLE XV.

Vergleich zwischen der antiglyoxalatischen Wirksamkeit des Cystins und der des wirksamen Konzentrates von Schweineniere.

Zeit (Min.)	Kontroll.			Nierenkon- zentrat 5 mg (Cystinge- halt 1,27 mg)			Nierenkon- zentrat 10 mg (Cystinge- halt 2,54 mg)	
		Cystin 1,3 mg			Cystin 2,5 mg			
Methylglyoxal-Verbrauch								
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
15	8,5	59,0	2,5	17,2	2,0	14,8	1,3	9,0
30	14,4	100,0	4,6	32,0	4,0	27,9	2,3	16,3
45			6,0	41,5	5,9	41,0	3,1	21,7
60			7,3	51,0	7,3	51,0	3,7	25,5
90			9,0	62,3	9,9	68,5	4,4	30,3
							3,8	27,0

antiglyoxalatischen Wirksamkeit des Cystins und demselben des antiglyoxalatisch wirksamen Konzentrates von Niere zog, und zwar auf Grund der in diesem Konzentrat enthaltenen, oben ausgerechneten Menge Cystin, so ergaben sich die Parallelen, wie sie in Tabelle XV aufgezeichnet sind. Im grossen und ganzen stimmten sie überein.

Auf Grund dieses Resultates darf man mit Recht annehmen, dass das Wesen des in den Geweben durch Autolyse entstandenen Inhibitors der Glyoxalase höchstwahrscheinlich im Cystin oder in einer dem Cystin ähnlichen Disulfidverbindung besteht.

IX. WIRKUNGSMECHANISMUS DES INHIBITORS DER GLYOXALASE.

Bei allen oben untersuchten antiglyoxalatischen Substanzen trat die Hemmungswirkung immer stärker im Laufe der Inkubation mit Glyoxalase auf. Bei nullstündigem Kontakt aber war die Hemmungswirkung sehr schwach. Tabelle XVI und Tabelle XVII zeigen dieses zeitliche Verhältnis der Hemmungswirkung, die sich bei den Versuchen mit dem antiglyoxalatisch wirksamen Konzentrat von Niere einerseits und mit Cystin andererseits ergab.

Die Antiglyoxalase von Niere und Pankreas hemmt nach Nagaya, Yamazoye und Nakamura (1936) und Purr (1938)

TABELLE XVI.

Kontakt des wirksamen Konzentrates von Schweineniere mit Glyoxalase.

Zeit (Min.)	Kontroll.		Kontaktdauer (St.)									
	0 St.		2 St.		0		0,5		1		2	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
Methylglyoxal-Verbrauch												
15	10,7	74,0	10,2	70,5	7,9	54,9	2,7	18,8	1,3	9,2	0,7	5,0
30	14,4	100,0	14,4	100,0	14,4	100,0	4,9	34,0	2,5	17,5	1,3	8,8
45							7,1	49,6	3,5	24,5	1,8	12,3
60							8,9	61,5	4,4	30,5	2,2	14,5
90							11,8	81,8	5,6	39,2	2,5	17,4

TABELLE XVII.
Kontakt des Cystins (3 mg) mit Glyoxalase.

Zeit (Min.)	Kontroll.		Kontaktdauer (St.)									
	0 St.		2 St.		0		0,5		1		2	
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
15	9,8	68,3	9,1	63,5	8,0	55,7	1,9	13,4	1,4	9,5	0,9	6,5
30	14,4	100,0	14,4	100,0	14,4	100,0	3,1	21,6	2,4	16,8	1,7	11,8
45							4,0	28,0	3,1	21,5	2,3	16,2
60							4,7	32,9	3,6	25,0	2,7	19,0
90							6,0	41,2	4,4	30,7	3,2	22,0

die Wirkung der Glyoxalase dadurch, dass sie im Laufe der Inkubation mit Glyoxalase auf Glutathion einwirkt, es aufspaltet und Cystein befreit. Wie es nun mit dem Inhibitor der Glyoxalase steht, und ob er im Laufe der Inkubation mit Glyoxalase auf das Ferment selbst, oder auf Glutathion einwirkt, diese Fragen sollte der nächste Versuch entscheiden.

Zunächst wurde Glutathion nach zweistündigem Kontakt von Cystin, Dithiodiglykolsäure oder dem antiglyoxalatisch wirksamen Konzentrat von Niere mit jener Glyoxalase, aus der mittels Dialyse Koferment beseitigt worden war, hinzugesetzt, und dann wurde diese Lösung auf ihre Fermentwirkung untersucht. Dabei konnte man fast gar keine merkbare Hemmung beobachten. So wurde es klar, dass der Inhibitor der Glyoxalase nicht auf das Ferment selbst zerstörend einwirkt.

So blieb deshalb nur noch übrig, festzustellen, ob etwa der Inhibitor der Glyoxalase auf das Coferment, Glutathion einwirke. Der Lösung dieser Frage galt der nächste Versuch. Nach zweistündigem Kontakt von Cystin, Dithiodiglykolsäure oder dem antiglyoxalatisch wirksamen Konzentrat von Niere mit Glutathion, setzte man dialysierte Glyoxalase hinzu, und untersuchte dann die Lösung auf ihre Fermentwirkung. Entgegen der Erwartung trat doch fast gar keine merkbare Hemmung ein.

Als dann aber eine dieser antiglyoxalatischen Substanzen, sowie dialysierte Glyoxalase und Glutathion diese drei zusammen 2 Stunden lang in Kontakt gesetzt wurden, ergab sich auffallend starke Hemmung. Dass diese Hemmung auf die Einwirkung der antiglyoxalatischen Substanz auf das Koferment zurückzuführen war, konnte durch folgende Experimente mit Sicherheit bestätigt werden. Nach der zweistündigen gemeinsamen Inkubation der drei Substanzen, nämlich, des Inhibitors, der dialysierten Glyoxalase und des Glutathions, wurde nochmals die gleiche Menge dialysierter Glyoxalase oder des Glutathions hinzugesetzt. Das Resultat dieses Versuches mit dem antiglyoxalatisch wirksamen Konzentrat von Niere zeigt Tabelle XVIII. Während demnach bei der nochmaligen Hinzusetzung von dialysierter Glyoxalase fast gar keine Reaktivierung der Fermentwirkung eintrat, erfolgte dieselbe bei der Hinzusetzung einer zweiten Dosis von Glutathion.

TABELLE XVIII.

Beseitigung der antiglyoxalatischen Wirkung des Nierenkonzentrates durch Glutathion.

- 3 ccm Konzentrat von Schweineniere + 5 ccm dialysierte Glyoxalaselösung + 2 ccm Glutathionslösung (0,5 mg) + 30 ccm Borsäure-Borax-Pufferlösung (PH 7,0).
- Nach 2 stündiger Aufbewahrung bei 37° C 2 ccm 0,1 M Methylglyoxallösung (14,4 mg) hinzugesetzt, mit Pufferlösung bis zu 50 ccm gefüllt.
 - Nach 2 stündigem Kontakt 2 ccm Glutathionslösung (0,5 mg) und das Substrat hinzugesetzt.
 - Nach 2 stündigem Kontakt 5 ccm dialysierte Glyoxalaselösung und das Substrat hinzugesetzt.
 - Kontrollversuch (3 ccm Wasser an Stelle des Nierenkonzentrates).
 - Bei nullständigem Kontakt das Substrat hinzugesetzt.

Zeit (Min.)	A		B		C		D		E	
	Methylglyoxal-Verbrauch									
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
15	0,6	4,5	6,5	45,0	1,0	7,0	10,1	70,0	5,6	39,0
30	1,0	7,0	11,9	82,5	1,7	11,5	14,4	100,0	9,9	69,0
45	1,3	9,2	14,4	100,0	2,2	15,0			14,4	100,0
60	1,4	10,2			2,4	17,2				
90	1,7	11,5			2,9	20,0				

TABELLE XIX.

Beseitigung der antiglyoxalatischen Wirkung des Cystins (3 mg)
durch Glutathion.

Untersuchungsmethode und Bedingungen die gleichen wie beim Versuch
von Tabelle XVIII.

Zeit (Min.)	A		B		C		D		E	
	Methylglyoxal-Verbrauch									
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
15	0,8	5,7	7,0	48,6	2,0	13,7	8,5	59,0	7,8	54,5
30	1,4	9,9	12,6	87,5	3,4	23,6	14,4	100,0	13,7	95,0
45	1,9	13,0	14,4	100,0	4,3	30,2			14,4	100,0
60	2,2	15,0			4,9	34,2				
90	2,4	16,8			5,6	39,0				

TABELLE XX.

Beseitigung der antiglyoxalatischen Wirkung der Dithiodiglykolsäure
(27,7 mg) durch Glutathion.

Untersuchungsmethode und Bedingungen die gleichen wie beim Versuch
von Tabelle XVIII.

Zeit (Min.)	A		B		C		D		E	
	Methylglyoxal-Verbrauch									
	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
15	0,7	5,0	6,6	45,8	1,6	10,8	8,3	57,5	6,9	48,0
30	1,2	8,5	11,3	78,5	2,7	18,7	14,4	100,0	12,2	85,0
45	1,6	11,0	14,4	100,0	3,5	24,0			14,4	100,0
60	1,8	12,5			3,9	27,0				
90	2,1	14,5			4,5	31,5				

und zwar fast zur gleichen Höhe der Fermentwirkung wie bei nullstündigem Kontakt. Diese Verhältnisse zeigten sich in fast gleicher Weise bei dem Versuch mit Cystin beziehungsweise mit Dithiodiglykolsäure, wie aus Tabelle XIX beziehungsweise aus Tabelle XX ersichtlich ist. Das Resultat dieser Versuche stimmte mit dem der folgenden Experimente, die zur Bestimmung des Glutathions gemacht wurden, vollkommen überein. Glutathion,

das antiglyoxalatisch wirksame Konzentrat von Niere und dialysierte Glyoxalase wurden gemeinsam unter Anwendung von Borsäure-Borax-Pufferlösung (PH 7,0) bei 37°C in Kontakt gesetzt, dem Ansatz im Laufe der Inkubation von Zeit zu Zeit Proben entnommen, und einerseits die jeweils übriggebliebene Menge des reduzierten Glutathions nach der Methode von Kühnau (1931) bestimmt, andererseits die Proben auf ihre Fermentwirkung untersucht. Das Resultat dieses Versuches zeigt Tabelle XXI. Man sieht daraus, dass die Menge des reduzierten Glutathions sich im Laufe der Inkubation progressiv verminderte; auch die Hemmung der Fermentwirkung verlief im Laufe der Kontaktzeit pro-

TABELLE XXI.

Antiglyoxalatische und glutathionvermindernde Wirkung des
Nierenkonzentrates.

25 ccm Konzentrat von Schweineniere + 75 ccm dialysierte Glyoxalase-Lösung + 50 ccm Glutathionslösung (60 mg) + 350 ccm Borsäure-Borax-Pufferlösung (PH 7,0), bei 37°C aufbewahrt. Proben zur Untersuchung der Fermentwirkung und zur Bestimmung des Glutathions entnommen.

Untersuchung der Fermentwirkung: 20 ccm vom Ansatz + 2 ccm 0,1 M Methylglyoxallösung (14,4 mg), mit Pufferlösung bis zu 50 ccm gefüllt.

Bestimmung des Glutathions: 20 ccm vom Ansatz, Kühnausche Methode.

Zeit (Min.)	Kontaktdauer (St.)							Methylglyoxal-Verbrauch							
	0	0,5	1	1,5	2	3	4	mg	%	mg	%	mg	%	mg	%
Glutathiongehalt (mg) bei 20 ccm vom Ansatz															
	3,55	3,25	2,93	2,55	2,47	2,08	1,70								
Fermentwirkung bei 20 ccm vom Ansatz															
25	12,8	89,0	7,9	54,5	6,2	43,0	5,1	35,5	4,0	28,0	3,1	21,4	2,1	14,7	
50	14,4	100,0	14,4	100,0	11,9	82,5	9,5	65,8	7,7	53,7	5,5	38,3	4,0	28,0	
75					14,4	100,0	12,9	89,5	10,7	74,5	7,5	52,2	5,5	38,0	

gressiv, und im grossen und ganzen im Verhältnis zum Grade der Verminderung des Glutathions. Diese Verhältnisse waren beim Versuch mit dem aus Autolysat der Schweineleber gewonnenen antiglyoxalatisch wirksamen Konzentrat dieselben. Da das antiglyoxalatische Konzentrat in geringer Menge eine mit Jod verbindbare Substanz, die nicht Glutathion war, enthielt, erhielt man die Menge des echten Glutathions, indem man aus den Zahlen des Hauptexperimentes die obige Menge abzog. Die so gewonnene Menge des echten Glutathions verminderte sich, wie Tabelle XXII zeigt, im Laufe der Inkubation progressiv und verschwand fast ganz bei 2,5 bis 3,0 stündigem Kontakt.

TABELLE XXII.

Verschwinden des Glutathions durch das wirksame Konzentrat von Schweineniere.

- A. 25 ccm Konzentrat von Schweineniere + 40 ccm dialysierte Glyoxalaselösung + 25 ccm Glutathionslösung (37,5 mg) + 160 ccm Borsäure-Borax-Pufferlösung (pH 7,0).
- B. 25 ccm Wasser an Stelle der Glutathionslösung; andere Bedingungen wie bei A.

Die Ansätze bei 37°C aufbewahrt, Proben für die Titration mit Jod nach der Bestimmungsmethode von reduziertem Glutathion von Kühnau entnommen.

	Kontaktdauer (St.)										
	0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	5	
Glutathiongehalt (mg) bei 20 ccm der Ansätze											
A	3,73	1,84	1,02	0,75	0,84	0,65	0,62	0,59	0,61	0,57	
B	0,55	—	—	—	0,50	—	—	—	—	0,51	
A-B*	mg	3,21	1,32	0,50	0,23	0,32	0,13	0,10	0,07	0,09	0,05
A-B*	%**	100,0	41,2	15,6	7,2	10,0	4,0	3,1	2,2	2,8	1,6

* 0,52 (Durchschnittszahl von B).

** Vergleichsunterschied in Prozent.

So wirkte also der Inhibitor auf das Koferment der Glyoxalase, Glutathion ein, liess es vermindern und verschwinden. Und, für

die Auslösung dieser Wirkung des Inhibitors war das gemeinsame Vorhandensein von Glyoxalase notwendig.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Es wurde konstatiert, dass ein Inhibitor der Glyoxalase durch Autolyse in den verschiedenen Geweben entstand. Die Autolysate von Niere, Leber und Pankreas zeigten eine besonders stark antiglyoxalatische Wirksamkeit.

2. Um den durch Autolyse entstandenen Inhibitor der Glyoxalase zu reinigen, wurden Versuche gemacht, durch die ein sehr stark wirksames Konzentrat gewonnen werden konnte.

3. Auch die mittels Trypsin gewonnenen Spaltprodukte der verschiedenen reinen Eiweissstoffe zeigten ebenfalls antiglyoxalatische Wirkung.

4. Die mittels Schwefelsäure erhaltenen Totalhydrolysate der verschiedenen reinen Eiweissstoffe waren ebenfalls antiglyoxalatisch wirksam.

5. Von allen hier untersuchten Aminosäuren zeigte nur Cystin allein antiglyoxalatische Wirkung, alle anderen waren unwirksam.

6. Ausser Cystin zeigten auch die Disulfidverbindungen wie Aneurindisulfid und Dithiodiglykolsäure stark antiglyoxalatische Wirkung.

7. Als Disulfidverbindungen durch Reduktion in die ihnen entsprechenden Sulfhydrylverbindungen umgewandelt wurden, verschwand die antiglyoxalatische Wirksamkeit sogleich.

8. Da es nachgewiesen werden konnte, dass die aus Autolysaten von Geweben gewonnenen antiglyoxalatisch stark wirksamen Konzentrate Disulfidverbindung enthielten, so darf man annehmen, dass das Wesen des durch Autolyse in den Geweben entstandenen Inhibitors der Glyoxalase höchstwahrscheinlich im Cystin oder in einer dem Cystin ähnlichen Disulfidverbindung besteht.

9. Der Inhibitor hemmte die Wirkung der Glyoxalase dadurch, dass er auf das Coferment dieses Fermentes, Glutathion einwirkte und es verschwinden liess. Für die Auslösung dieser

Wirkung des Inhibitors war das gemeinsame Vorhandensein von Glyoxalase notwendig.

Zum Schlusse möchte ich Herrn Prof. Dr. N. Ariyama meinen aufrichtigsten Dank aussprechen, für sein überaus freundliches Entgegenkommen und seine vielen Ratschläge, mit denen er meine Arbeit unterstützte.

LITERATUR.

- Ariyama, N. (1928): J. Biol. Chem., **77**, 359.
 Claesson, P. (1881): Berichte, **14**, 409.
 Dakin, H. D. & H. W. Dudley (1913): J. Biol. Chem., **14**, 155 & 423.
 Foster, D. L. (1925): Biochem. J., **19**, 757.
 Foster, D. L. & C. E. Woodrow (1924): Biochem. J., **18**, 562.
 Girsavicius, J. O., P. H. Efendi & A. P. Ryzhowa (1934): Biochem. Z., **274**, 87.
 Girsavicius, J. O., P. H. Efendi & A. P. Ryzhowa (1936): Fermentforschung, **15**, 32.
 Girsavicius, J. O. & A. P. Ryzhowa (1935): Biochem. Z., **278**, 252.
 Hunter, G. & B. A. Eagles (1927): J. Biol. Chem., **72**, 167.
 Kisch, B. (1933): Biochem. Z., **257**, 334.
 Kobayasi, S. (1938): J. Biochem., **27**, 107.
 Kossel, A. & F. Kutscher (1900): Z. physiol. Chem., **31**, 165.
 Kühnau, J. (1931): Biochem. Z., **230**, 353.
 Nagaya, K., S. Yamazoye & S. Nakamura (1936): J. Biochem., **23**, 41.
 Neuberg, C. & M. Kobel (1927): Biochem. Z., **185**, 477; **188**, 197.
 Platt, M. E. & E. F. Schroeder (1934): J. Biol. Chem., **106**, 179.
 Purr, A. (1938): Enzymologia, **2**, 350.
 Sakuma, F. (1930): J. Biochem., **12**, 247.
 Schroeder, E. F., M. P. Munro & L. Weil (1935): J. Biol. Chem., **110**, 181.
 Watanabe, J. (1933): J. Biochem., **17**, 307.
 Woodward, G. E., M. P. Munro & E. F. Schroeder (1935): J. Biol. Chem., **109**, 11.
 Yamazoye, S. (1936): J. Biochem., **23**, 319.
 Zima, O., K. Ritsert & Th. Moll (1941): Z. physiol. Chem., **267**, 210.

BIOCHEMICAL STUDIES ON GUANIDINE-BODIES.

I. Reaction between ammonia and amino compound in the presence of charcoal.

By

SHINICHI SHIBUYA.

(From the Institute of Biochemistry, Tokyo Imperial University.
Director: Prof. Dr. S. Kakiuchi.)

(Received for publication, December 8, 1941)

I. INTRODUCTION.

In the previous publication, the author (1939) reported that in the animal body creatine is formed from glycine through glycocyamine. The present paper deals with the mechanism of formation of guanidine-bodies in general.

As to the mechanism of formation of arginine, one of the ω -guanido compounds, Krebs and Henseleit (1932) proposed that ornithine reacts with ammonia and carbon dioxide to form carbamido-ornithine from which arginine is produced by the action of ammonia. Previous to Krebs et al. Salkowski (1873) separated carbamido-taurine from the urine of a man and dog after the administration of taurine. Later Dakin (1909) isolated carbamido-phenylalanine, or α -ureido- β -phenylpropionic acid, from the urine of a cat after the injection of phenylalanine. These results seem to support the Krebs and Henseleit's view and indicate that not only ω - but also α -amino compounds form carbamido-bodies as the first step of guanidization of amino compounds. However, this does not necessarily imply that the succeeding step is the same for the two compounds. Moreover, there is a possibility that the guanidization and methylation are modified according to the species of organisms or to the kind of amino compound. The difficulty of the transformation of taurine or taurocyamine into asterubine (Ackermann, 1936) supports this view. If the Krebs and Henseleit's view is correct it is suspect-

ed that ϵ -amidinolysine, a homologue of arginine, is present in the organism. No attempt has, however, succeeded in its isolation (Winterstein and Küng, 1909; Kossl and Weiss, 1913; and Steib, 1926). It must, of course, wait for a further study to definitely establish this fact.

With regard to the formation of creatine, Bloch and Schoenheimer (1940) recently expressed the view that it is formed directly from glycocyamine, a guanidization product of glycine. They neglected, however, the existence of hydantoic acid as its intermediary compound.

It seems to the present author that the confusion in the elucidation of the mechanism of creatine formation has been caused by the following reasons: Firstly the reaction has been carried out in a complex medium and, secondly, the consideration of the reactions of substances analogous to creatine under the same condition has been neglected.

Various guanidine-bodies found in the organisms are listed in Table I, which clearly shows that they are all ω -guanido compound* with a simple or a somewhat modified straight chain. This fact indicates that their formation from ω -amino compounds** by guanidization is highly probable. Ackermann (1935) applied the guanidization of amino compound without any experimental proof to the formation of guanidine-bodies in the organisms.

It is well known that though ω -guanidine-bodies and α -amino compounds have frequently been detected in the organism, α -guanido compound except glycocyamine has not been found at all. This fact also supports the author's view that ω -amino compounds are essential for the formation of guanido compounds in the organism. The possibility that the guanidine-bodies are produced in the organism by the action of cyanamide upon amino

* Among the guanidine-bodies only creatine and vitiatine have *N*-methyl group. The author considers that they are formed by the guanidization and subsequent methylation of their precursors. Asterubine which has *N*-dimethyl group is likely formed by the similar mechanism. Methyl- and dimethyl-guanidine are probably the decomposition products of their higher homologues.

** Glycine is an α - as well as a ω -amino acid.

compounds is doubtful, as such a reaction is not restricted to only ω -amino compounds as will be shown in Table V.

TABLE I.

(1) C. J. Weber: *J. Biol. Chem.*, **109**, XCVI (1935), (2) M. Bodansky: *J. Biol. Chem.*, **115**, 641 (1936), (3) D. Ackermann: *Z. Physiol. Chem.*, **232**, 206 & **234**, 208 (1935), (4) M. Kitagawa et al.: *J. of Biochem.*, **16**, 339 (1932) & **23**, 181 (1936), (5) K. Yoshimura: *J. of Biochem.*, **1**, 343 (1922), (6) D. Ackermann et al.: *Z. Biol.*, **82**, 278 (1924), (7) W. Keil et al.: *Z. Biol.*, **86**, 187 (1927), (8) M. Honda: *J. of Biochem.*, **2**, 351 (1923); (9) L. Leibfreid: *Z. Physiol. Chem.*, **139**, 82 (1924), (10) H. Müller: *Z. Biol.*, **83**, 239 (1925), (10) E. Späth and S. Prokopp: *Ber. Chem. Ges.*, **57**, 474 (1924), (11) R. Engeland and F. Kutscher: *Zentrbl. f. Physiol.*, **24**, 479 (1910), (12) F. Kutscher: *Z. Physiol. Chem.*, **51**, 457 (1907), (13) F. Kutscher, D. Ackerman et al.: *Z. Physiol. Chem.*, **199**, 273 (1931), (14) K. Morizawa: *Acta schol. medicin. Kioto*, **9**, 285 (1927), (14) S. Akashi: *J. of Biochem.*, **25**, 261 (1937).

With the purpose of confirming this view, a series of model experiments was carried out with various amino compounds by

using ammonia and charcoal. The use of charcoal was based upon the supposition that it might facilitate the guanidization.

As will be shown in the experimental part, when an aqueous mixture of glycine, ammonia, and charcoal is allowed to stand for a certain hour at 37°C, the formation of a substance is observed, which gives the Sakaguchi reaction. In consideration of the well-known specificity of the reaction, there is no doubt that the product is glycocyamine.

The possibility of presence of cyanamide in the charcoal preparation employed in this work is excluded by the experimental results shown later. The participation in the guanidization of carbon dioxide which is present ordinarily in the charcoal or is formed from amino compounds and charcoal, is probable.

II. MATERIALS.

1. *Charcoal.* In addition to sugar charcoal Merck's medicinal charcoal was used after various treatments.

a) Untreated charcoal. The Merck's preparation was used after drying in a desiccator without any further treatment.

b) Acid-treated charcoal. 20 gms. of the preparation were heated for 6 hours on a boiling water-bath with 350 cc. of 2*N* HCl, with the occasional addition of water. The supernatant liquid was then decanted and 500 cc. of distilled water were added to the residue. After standing on the bath for about 30 minutes with an occasional stirring, the charcoal was separated from the liquid. The same process was repeated until the washing showed no more Cl⁻ reaction. The charcoal was then filtered under suction, washed several times with water, and dried on the bath.

c) Alkali-treated charcoal. 30 gms. of the preparation were treated similarly as in acid treatment except that 1*l* of 10 per cent KOH was used in place of HCl. When the final washing showed pH 6.0 the charcoal was dried at first on the bath and finally for 1.5 hours in an oven at 120°C.

d) Acid and alkali-treated charcoal: To 20 gms. of the preparation 200 cc. of 30 per cent HCl were added and the mixture was treated as in the case of acid-treated charcoal. When the HCl

concentration of the final washing became about 0.3 N, the mixture was heated for 2 hours before filtration. The charcoal remaining on the filter was washed 50 times with 100 cc. of hot water each time. The final washing gave practically no Cl^- reaction. 300 cc. of 10 per cent NaOH were then added to the charcoal and the mixture was boiled for 2 hours. The alkaline solution was then decanted and the residue was washed with 500 cc. of water as indicated above. The washing was repeated until the supernatant liquid showed pH 9.6. At this pH a great portion of the charcoal becomes suspended in water while a small portion remains at the bottom of a container. The former was collected on a filter and the latter was discarded. The charcoal on the filter was washed repeatedly with water until the final washing showed pH 6.0. It was then suspended in water and CO_2 was passed for 15 minutes, after which it was filtered off, washed with hot water until no more carbonate reaction was given, and dried as in the previous case.

e) Sugar charcoal. This was prepared from pure cane sugar by the ordinary method and was activated by a water vapor.

f) Pre-used charcoal. The Merck's charcoal previously used for the production of glycoeyamine was washed with the sufficient amount of water and dried as previously indicated.

2. *Amino compounds.* Glycocol, α -alanine and glutamic acid were used. They are all Takeda's preparation.

3. *Ammonia solution (10 per cent).* A preparation of the Japanese pharmacopoeial standard was used without any further purification.

4. *Cyanamide solution.* Schuchardt's sodium cyanamide was found to contain 90 per cent cyanamide. Its aqueous solution was neutralized to pH 6.0 with dilute HCl or H_2SO_4 and made up to a definite volume with water.

III. TECHNIQUE.

A definite amount of amino compound was dissolved in a mixture of 30 cc. of distilled water and 0.5–1.0 cc. of the ammonia solution, to which one of the charcoal preparations was added

(Table II). The charcoal was used for the twofold purposes, one as a catalyst of the guanidization and the other as an adsorbent for the product. After stoppering the container, it was shaken for a while and kept for a definite interval of time in a thermostat at 37°C. Guanido compound thus formed was determined by the following method. When the formation of this compound by cyanamide was examined, charcoal was replaced by the cyanamide solution.

TABLE II.

Distilled water	30 cc.
Amino compound	a definite amount(gm.)
Ammonia solution (10%)	0.5-1 cc.
Charcoal	1 gm.

Determination of guanido compound.

The Sakaguchi reaction was applied for the determination of guanido compound. The presence of amino compound, however, disturbs the color production of guanido compound as reported by Weber (1930). This necessitates the separation of the latter from the former before the colorimetry.

This was attained in the following manner: The flask containing the reaction mixture is taken out of the thermostat and cooled to a room temperature. The mixture is filtered under a suction through a glass-filter on which a hard filter paper has been closely fitted. The charcoal sticking to the wall of the flask is completely transferred to the filter with water. The charcoal thus collected on the filter is washed several times to remove the amino compound. The guanido compound formed in the mixture and adsorbed by the charcoal is separated by washing ten times with 3 cc. of 60 vol. per cent ethanol each time. This is sufficient for the complete elution of the compound. The whole eluate is quantitatively transferred into a dish and evaporated on a boiling water-bath to complete dryness. The residue is frequently contaminated with a minute amount of charcoal. This is removed as follows: The evaporation residue is dissolved in about 1 cc. of hot water and the resulting solution is filtered into a test tube marked at 5 cc. through a small glass-filter equipped as previously indicated.

The washing is repeated several times and the washings are added to the contents of the tube. The total volume of the washings should not exceed 5 cc. The clear solution thus obtained is then made up exactly to 5 cc. by the addition of water. With this solution, the guanidine-body is estimated according to the Sakaguchi method modified by Weber (1930) by using a pure glycocyamine solution as standard. Thus, the amount of guanido compound determined is expressed in the glycocyamine equivalent. Generally 0.2 cc. of hypobromite solution is necessary for the test solution to obtain maximum color production. For the standard solution, however, 0.1 cc. is sufficient. The solution containing 0.005–0.05 mg of glycocyamine in 5 cc. is suitable for the colorimetry.

By the actual determination, it was confirmed that the maximum amount of glycocyamine adsorbed is about 1 mg. when 30 cc. of its 5 mg per cent solution is shaken with 1 gm. of Merck's charcoal for ten minutes at 37°C. This amount is influenced neither by the reaction of the medium, if it is in the neighbourhood of neutrality, nor by the time of shaking if it is within 5 hours. It was also found that with 5 minutes' shaking at a room temperature, 1 gm. of Merck's charcoal is sufficient for complete adsorption of 0.15 mg glycocyamine in 30 cc. of its solution, containing 0.1 gm. of glycine with or without ammonia.

The accurate determination of glycocyamine, therefore, can be made by this method if its concentration in the test solution is less than 0.15 mg in 30 cc. The results listed in Table V indicate that this is also the case with other guanido compounds.

When the formation of guanido compounds by the action of cyanamide was tested, 1 gm. of the untreated charcoal is added to the reaction mixture which has been kept for definite intervals of time in a thermostat at 37°C. The mixture is then shaken for 5 minutes at a room temperature and filtered through the glass-filter to determine the guanidine-bodies by the manipulation as afore-mentioned. Within such a short interval of time as 5 minutes, however, no production of guanidine-body was observed in the mixture of amino compound, ammonia and charcoal.

IV. EXPERIMENTS AND DISCUSSION.

The experimental conditions have been described in "Technique". The results obtained are tabulated in Table III-VII. The approximate pH values of the reaction mixtures were measured by the pH indicator paper.

(1) *Formation of guanidine-bodies in the presence of various charcoal preparations.*

As is seen in Table III and IV, whenever glycine, ammonia and charcoal are present in a solution a substance is formed which gives the Sakaguchi reaction. As stated in "Introduction" the product is, no doubt, glycoxyamine. The results of Table III also indicate that the amount of glycoxyamine formed generally increases

TABLE III.

Exp. No.	Glycine	Ammonia solution	Charcoal	Reaction time	pH of react. mix.	Glycoxyamine equivalent
1	0.1 g. (=1.3 mM.)	0.5 cc. (=2.8 mM.)	U.C. 1 g.	24 hrs.	8.2	0.0078 mg.
2	"	"	A.C.	24	8.2	0.0055
3	"	"	A.B.C	24	8.3	0.0060
4	"	1.0 cc. (=5.6 mM.)	U.C.	20	8.9	0.0116
5	"	"	B.C.	20	9.3	0.0134
6	"	"	A.C.	20	8.9	0.0096
7	"	"	U.C.	24	9.0	0.0113
8	"	"	P.U.C.	24	9.0	0.0145
9	"	"	U.C.	24.5	8.9	0.0140
10	"	"	S.C.	24.5	9.3	Trace
11	"	"	U.C.	116	8.4	0.0085
12	"	"	S.C.	116	9.3	0.0060
13	"	—	U.C.	23	5.8	0
14	"	1.0 cc.	—	116	9.3	0
15	—	0.5 cc.	U.C.	24	8.9	0

U.C.: untreated charcoal.

A.B.C.: acid and alkali-treated charcoal.

P.U.C.: pre-used charcoal.

A.C.: acid-treated charcoal.

B.C.: alkali-treated charcoal.

S.C.: sugar charcoal.

TABLE IV.

Exp. No.	Amino acid		Charcoal	pH of react. mix.	Glycocyamine equivalent
16	Glycine	0.01 g. (=0.13 mM)	U.C. 1 g.	9.4	0.0035 mg.
17	α -Alanine	0.012 (=0.13 ")	U.C.	9.4	0
18	Glutamic acid	0.02 (=0.13 ")	U.C.	9.3	0
19	Glycine	0.1 (=1.3 ")	A.B.C.	9.2	0.0146
20	α -Alanine	0.12 (=1.3 ")	A.B.C.	9.2	+0
21	Glutamic acid	0.2 (=1.3 ")	A.B.C.	9.2	0

In these experiments, the amount of the ammonia solution added was 1 cc., and the reaction time was 24 hours.

The glutamic acid solution was neutralized with 10% NaOH-solution before the addition of the ammonia solution and charcoal.

The symbol (+0) indicates that the glycocyamine equivalent is practically zero.

with the alkalinity of the reaction medium. In case when one of the three reactants is absent, glycocyamine formation is not observed at all. As to the amount of the product different charcoal preparations give practically the same result. This indicates that the reaction is not due to the action of cyanamide present in the preparations as an impurity. Cyanamide is readily transformed into urea by the treatment with acid and heat as will be shown later. The velocity of the production of glycocyamine decreases more or less when the acid-treated preparation is employed. This tendency becomes predominant when sugar charcoal is used, i.e. it takes about 5 days to yield the product in practically the same concentration. In consideration of the experimental results with cyanamide shown later, it is evident that these results are not due to the small amount of cyanamide present in the two charcoal preparations. It is highly probable that they are due to the minute amount of an unknown substance which is present in charcoal and accelerates this reaction. It is worthy to note that among the three amino acids used glycine is the only substance that forms guanido compound in the experimental conditions.

(2) *Formation of guanidine-bodies by cyanamide.*

In order to find out conditions of the reactions suitable for the comparison of the guanidization by cyanamide with that by charcoal, the experiments shown in Table V were carried out. The concentrations of cyanamide used in Experiments 22, 23, 24, 27 and 28 were thus employed for the comparison discussed in the following section.

TABLE V.

Exp. No.	Amino acid	Cyanamide solution	React. time	pH of react. mix.	Glycoeyam. equiv.
22	Glycine 0.1 g.	2.2% ²⁾ 1 cc. (= 0.52 mM.)	24 hrs.	9.6	0.0230 mg.
23	α -Alanine 0.12	2.2 1 (= 0.52)	24	9.6	0.0350
24	Glut. acid ³⁾ 0.2	2.2 1 (= 0.52)	24	9.6	0.0043
25	α -Alanine 0.1	1.3 ³⁾ 1 (= 0.31)	23	9.5	0.090
26	α -Alanine 0.1	0.27 ⁴⁾ 1 (= 0.064)	22	9.5	0.14
27	Glycine 0.083	0.0176 ⁵⁾ 1 (= 0.004)	22	9.5	0.0090
28	α -Alanine 0.1	0.0176 1 (= 0.004)	22	9.5	0.0056
29	Glycine 0.083	0.0014 ⁶⁾ 1 (= 0.0003)	21	9.5	+0
30	α -Alanine 0.1	0.0014 1 (= 0.0003)	21	9.5	0

In each experiment 1 cc. of the ammonia solution was used.

0.083 gm. of glycine or 0.1 gm. of alanine corresponds to 1.1 m. mole.

³⁾ The solution of glutamic acid in 30 cc. of water was neutralized with 10% NaOH solution before the addition of the ammonia solution and charcoal.

²⁾ This solution was prepared by neutralizing cyanamide with dilute hydrochloric acid. When a mixture of 1 cc. of this cyanamide solution, 9 cc. of water and 1 cc. of 2N hydrochloric acid solution was heated for one hour in a boiling water-bath, yellowish silver cyanamide was not produced by the addition of ammoniacal silver nitrate solution.

⁴⁾ The solution was made by neutralizing cyanamide with dilute hydrochloric acid.

^{5), 6)} These solutions were prepared by neutralizing cyanamide with dilute sulfuric acid.

Comparison of the reactions by charcoal and by cyanamide.

The results of the experiments, already shown in Table IV and V, are summarized in Table VI for the sake of comparison.

TABLE VI.

Exp. No.	Amino acid	Charcoal	Cyanamide solution	React. time (hrs.)	pH of react. mix.	Glycocyanam. equiv.
16	Glycine 0.01 g.	U.C. 1 g.	—	24	9.4	0.0035 mg.
17	α -Alanine 0.012	U.C.	—	24	9.4	0
18	Glutamic acid 0.02	U.C.	—	24	9.3	0
19	Glycine 0.1	A.B.C.	—	24	9.2	0.0146
20	α -Alanine 0.12	A.B.C.	—	24	9.2	+ 0
21	Glutamic acid 0.2	A.B.C.	—	24	9.2	0
22	Glycine 0.1	—	2.2 % 1cc.	24	9.6	0.0230
23	α -Alanine 0.12	—	2.2	24	9.6	0.0350
24	Glutamic acid 0.2	—	2.2	24	9.6	0.0043
27	Glycine 0.083	—	0.0176	22	9.5	0.0090
28	α -Alanine 0.1	—	0.0176	22	9.5	0.0056

It is seen that while cyanamide brings about the guanidization of α -alanine to a marked degree, charcoal has no effect upon the amino acid. The reaction of glycine induced by charcoal is therefore of great interest when its analogous reaction occurring in the organism is considered. The failure of guanidization of α -alanine by the charcoal preparations shows that they do not contain cyanamide as an impurity.

(3) *Formation of guanidine-bodies in the presence of charcoal together with cyanamide.*

In order to see whether or not charcoal accelerates the guanidization of the amino acids by cyanamide, the experiments shown in Table VII have been carried out.

Comparison of the result of Experiment 32 with those of 31 and 27 clearly shows that charcoal has no catalytic effect upon the guanidization by cyanamide. The reaction catalysed by charcoal and caused by cyanamide proceeds independently. The same relation is also observed in Experiments 34, 33 and 28.

The possibility that cyanamide present in charcoal as an impurity may act upon amino compound to produce guanidine-body

TABLE VII.

Exp. No.	Amino acid	Charcoal	Cyanamide solution	React. time	pH of react. mix.	Glycoecyamine equivalent
31	Glycine 0.083 g.	B.C. 1 g.	—	22 hrs.	9.5	0.0098 mg.
27	Glycine 0.083	—	0.0176 % 1 cc.	22	9.5	0.0090
32	Glycine 0.083	B.C. 1	0.0176 1	22	9.5	0.0181
33	α -Alanine 0.1	B.C. 1	—	22	9.5	+0
28	α -Alanine 0.1	—	0.0176 1	22	9.5	0.0056
34	α -Alanine 0.1	B.C. 1	0.0176 1	22	9.5	0.0048
29	Glycine 0.083	—	0.0014 1	21	9.5	+0
35	Glycine 0.083	B.C. 1	0.0014 1	21	9.5	0.0097
30	α -Alanine 0.1	—	0.0014 1	21	9.5	0
36	α -Alanine 0.1	B.C. 1	0.0014 1	21	9.5	+0
25	α -Alanine 0.1	—	1.3 1	23	9.5	0.090
37	α -Alanine 0.1	U.C. 1	1.3 1	23	9.4	0.090

In each experiment 1 cc. of the ammonia solution was added.

is eliminated by the fact that it is transformed to urea by treating it with HCl. It is well known that cyanamide is transformed to urea by the action of dilute hydrochloric acid. In order to secure a further proof that this is the case even with cyanamide added to the charcoal preparation, the following experiment was carried out. A mixture of 1 cc. of 1.3 per cent cyanamide solution and 1 gm. of the untreated charcoal in 30 cc. of water is shaken for 5 minutes at a room temperature. 3 cc. of 2N HCl are then added to the mixture and it is heated in a boiling water-bath for 2 hours with an occasional agitation. After cooling, the mixture is neutralized to pH 6.0 with 10 per cent NaOH-solution. 1 cc. of 10 per cent ammonia solution and 0.1 gm. of α -alanine are then added to the neutralized mixture and it is thoroughly shaken. The pH of the solution is thus elevated to 9.4. Finally the mixture is kept for 23 hours at 37°C. No guanidization of α -alanine by this treatment was observed. This indicates that the guanidization by the action of charcoal is not due to cyanamide present in it.

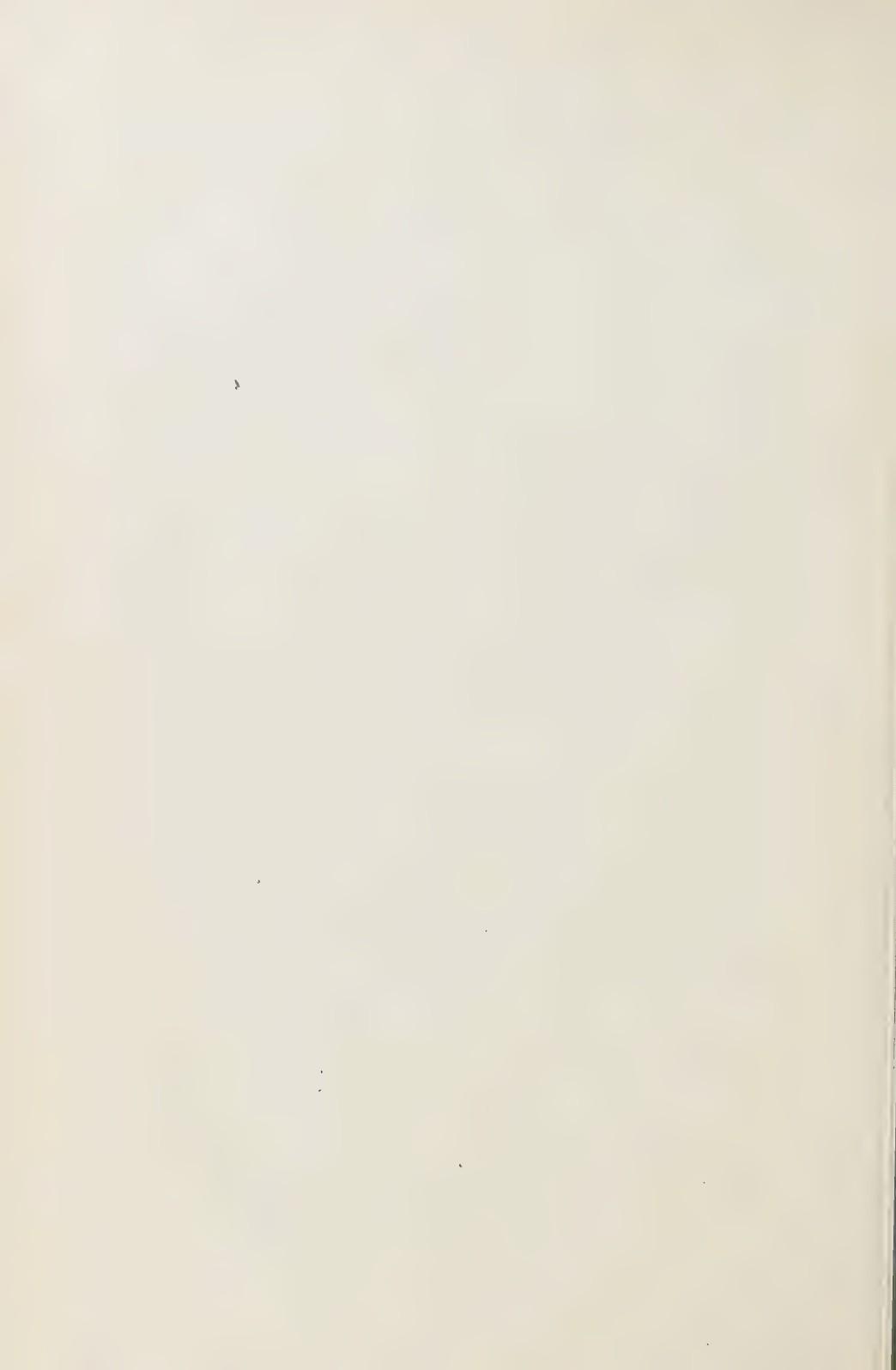
V. SUMMARY.

It has been established that glycine is guanidized by the catalytic action of charcoal in the presence of ammonia. With respect to the mechanism of this reaction further study is intended. The fact that this reaction is not due to the action of cyanamide present in charcoal as an impurity is evident. It is of interest to note that glycine is converted into guanido compound, while α -alanine or glutamic acid remains unchanged under the same condition. These experimental results support the view that ω -amino group is essential for the formation of guanidine-bodies in the organisms.

The author would like to express his hearty thanks to Prof. Kakiuchi for his kind advice and criticism throughout the course of this research.

BIBLIOGRAPHY.

- Ackermann, D. (1935): Z. Physiol. Chem., **234**, 208.
Ackermann, D. (1936): Z. Physiol. Chem., **239**, 231.
Bloch, K. and S. Schoenheimer (1940): J. Biol. Chem., **133**, 633 & **134**, 785.
Dakin, H. D. (1909): J. Biol. Chem., **6**, 235.
Kossel, A. and F. Weiss (1913): Z. Physiol. Chem., **84**, 1.
Krebs, H. A. and K. Henseleit (1932): Z. Physiol. Chem., **210**, 33.
Kutscher, F. (1907): Z. Physiol. Chem., **51**, 457.
Salkowski, E. (1873): Ber. Chem. Ges., **6**, 744.
Steib, H. (1926): Z. Physiol. Chem., **155**, 292.
Shibuya, S. (1939): J. of Biochem., **29**, 339.
Weber, C. J. (1930): J. Biol. Chem., **86**, 217.
Winterstein, E. and A. Küng (1909): Z. Physiol. Chem., **59**, 141.



BIOCHEMICAL STUDIES ON THE RICE OF CHOSEN.

III. On the fat of the rice-bran.

By

SEIKO YAMASAKI.

(*The Biochemical Laboratory of the Scientific Department of the Kyoto Imperial University.*)

(Received for publication December 20, 1941)

From the investigations made hitherto on the rice-bran, the presence of a large quantity of free acid seems to be its characteristic.

In order to biochemically study the nature of fat, it is desired to know whether there is any difference between fatty acids forming free acid and those constituting neutral oil, and thus the present investigation was undertaken.

According to the investigation made by Hata (Table I) on the oil from the seed of Kaido (oil of seed of *Calophyllum Inophyllum*, Linn) produced in the Kainan Island, it seems that there is no great difference between the fatty acid constituting free acid and that of neutral fat.

TABLE I.

Fatty acid	Palmitic acid %	Stearic acid %	Oleic acid %	Linoleic acid %
Fatty acid of Neutral oil	18.5	10.7	48.6	22.2
Fatty acid of Acidic oil	17.1	15.0	34.8	17.1

About the chrysalis oil, which is considered to have much free acid, Kawase and his colleagues observed that the fatty acid composing the oil consists of palmitic acid 25%, oleic acid 60% and linoleic acid 15%, and the rate of fatty acid does not differ either in the case of free acid or in the case of neutral oil, but the result of the investigations made by Hiki and Nishikawa (Table II) shows that though there is no wide difference in the fatty acid of

the male chrysalis, in the oil of the female chrysalis, especially in the quantity of C₁₆, C₁₈ unsaturated fatty acid, a little difference was observed.

TABLE II.

	Male ♂	Female ♀
Free acid	53	80

In order to compare the free acid with the fatty acid constituting the neutral oil, the rice-bran prepared from Showa 15th year Riku-u No. 132 rice grown by nitrogen manures in the Western Chosen farm of the Fuji Kogyo Company was extracted with petroleum ether. 600 gms (yield 21%) of extract were obtained from 2.9 kgms of bran, and its physical constants are shown in Table III.

TABLE III.

D ₄ ²⁵	n _D ²⁵	Iod. Val.	Acid Val.	Sap. Val.
0.913	1.468	103	74	186.8

TABLE IV.

Rice oil	D	n	Iod. Val.	Acid Val.	Sap. Val.	Investigators
Produced in Chosen	15° 0.92084	—	103.1	81	192	K. Takahashi
Produced in Niigata	15.5° 0.92357	20° 67.0 (Butyrometer)	105.8	122	189	"
Produced in Okayama	15° 0.9273	20° 1.4742	107.6	34	184	M. Tsujimoto

Comparing the above results (Table III) with those (Table IV) obtained by Tsujimoto and Takahashi, there is little or no difference in the iodine and saponification values, but some difference is observed in the acid value.

To 549 gms of the bran-oil, 770 cc. of 1*N*-potassium hydroxide were added, and the neutral oil was separated with ether. The soap was acidified with 25% sulphuric acid, and free fatty acid

thus formed was extracted with ether. The result was as follows; free acid 209 gms (38%) (calculated value from acid value as oleic acid 37%), neutral oil 306 gms (56%) (calculated value from acid value 63%), and the loss 34 gms (6%). The physical constants of the free acid and the neutral oil are shown in Table V.

TABLE V.

	Free acid	Neutral oil
D ₄ ²⁵	0.909	0.920
n _D ²⁵	1.466	1.471
Iod. Val.	101.6	103.5
Sap. Val.	—	184.5
Neut. Val.	198.4	—
Mean Mol. Wt.	282.8	—

The fatty acid was separated as methyl ester by the Haller method. 500 cc. of methanol containing 2% hydrochloric acid were added to 187 gms of the free acid, and heated for four hours on a water bath. Then the alcohol was distilled; the same process was repeated again, obtaining 182 gms (93% of theoretical value) of crude methyl ester having the following properties (Table VI).

TABLE VI.

D ₄ ²⁵	n _D ²⁵	Iod. Val.	Sap. Val.
0.889	1.456	99.0	190.1

The crude methyl ester was fractionally distilled four times under 15 mm pressure, and the result was as shown in Table VII.

In the Table VII, fraction 1 is considered to consist chiefly of methyl miristate, fraction 3 of methyl palmitate, fraction 2 of a mixture of miristate and palmitate, fraction 5 of methyl ester of C₁₈ fatty acid, and fraction 4 is considered to be a mixture of methyl ester of C₁₆ and C₁₈ fatty acids.

The results of an elementary analysis of fractions 3 and 5 agree with the theoretical value of methyl ester of C₁₆ and C₁₈

TABLE VII.

Fraction	Temp. $t^{\circ}\text{C}$	Yield gm	D_4^{25}	n_D^{25}	Iod. Val.	Sap. Val.
1	125—175	1.7	0.866	1.442	18.0	220.7
2	175—193	3.7	0.866	1.442	22.3	205.4
3	193—198	17.5	0.867	1.443	27.6	204.9
4	198—205	12.7	0.873	1.448	85.4	191.0
5	205—216	95.3	0.879	1.452	118.0	189.5
Residue		24.0 (Sum of four distillations)				
Loss		5.9 (" " " ")				

fatty acid respectively.

The fraction 5 which was supposed to consist of both C_{18} saturated and unsaturated acids, was separated to fatty acids by the cooling method. 93 gms of oil were saponified with 36% aleoholic potash on a water bath for 2 hours and acidified. The fatty acids thus formed were separated, washed with water and dried on the water bath. 88 gms (99% of theoretical value) of fatty acid of the following constants shown in Table VIII were obtained.

TABLE VIII.

D_4^{24}	n_D^{25}	Iod. Val.	Neut. Val.	M. Mol. Wt.
0.895	1.461	124.9	199.0	282.0

TABLE IX.

Fraction	Weight gm.	Iod. Val.
1	1.4	1.5
2	0.5	1.8
3	34.2	88.3
4	4.5	144.0
5	4.0	146.9
6	5.0	156.8
7	8.8	160.4
8	19.9	158.6
Loss	7.2	

85.4 gms of the mixed fatty acid dissolved in 854 cc. of acetone, which were cooled to -20°C and then to -60°C , were separated into 8 parts (Table IX) of stearic, oleic and linoleic acids. The quantity of stearic, oleic, and linoleic acid was calculated from the iodine value of each part and mole ratio was found to be 3, 58, and 39 (Table X).

TABLE X.

Fatty acid	Weight gm.	Mol. ratio %
Stearic acid	2.5	3
Oleic acid	45.1	58
Linoleic acid	30.7	39

The weight and mole ratio of the free acid of the oil from physical constants were calculated and the results were shown in Table XI.

TABLE XI.

Fatty acid	Weight gm.	Mol. ratio %
Miristic acid	2.5	2
Palmitic acid	22.0	19
Stearic acid	3.0	2
Oleic acid	58.1	46
Linoleic acid	39.0	31

In the same way as in the case of acidic oil, neutral oil was transformed into methyl ester, and was separated to each methyl ester of fatty acid by the fractional distillation. The fraction

TABLE XII.

	Methyl ester of fatty acid constituting neutral oil	Methyl ester of free fatty acid
D_4^{25}	0.896	0.889
n_D^{25}	1.457	1.456
Iod. Val.	101.8	98.6
Sap. Val.	192.4	190.1

corresponding to C₁₈ acid methyl ester was made from fatty acid, and by the cooling method stearic, oleic, and linoleic acid were separated from 10% acetone solution. 197 gms of crude methyl ester having the constant of Table XII were obtained from 206 gms of neutral oil, and comparing this with the above free fatty acid methyl ester, there is a very little difference in the specific gravity.

The results of the fractional distillation for methyl ester conducted four times under 15 mm pressure are shown in Table XIII.

TABLE XIII.

Fraction	Temp.	Yield gm	D ₄ ²⁵	n _D ²⁵	Iod. Val.	Sap. Val.
1	125—175	1.7	0.863	1.442	16.7	220.7
2	175—193	5.0	0.866	1.442	20.0	208.3
3	193—198	28.5	0.869	1.444	38.4	206.4
4	198—205	6.4	0.873	1.448	70.6	199.9
5	205—216	79.7	0.879	1.452	116.5	189.1
Residue		25.6 (Sum of four distillations)				
Loss		5.7 (" " ")				

TABLE XIV.

	C ₁₈ fatty acid constituting neutral oil	C ₁₈ fatty acid constituting free acid
D ₄ ²⁵	0.896	0.895
n _D ²⁵	1.461	1.461
Iod. Val.	119.3	124.9
Neut. Val.	198.9	199.0
M. Mol. Wt.	282.1	282.0

75.6 gms of methyl ester of C₁₈ fatty acid (fraction 5) were heated with 45 gms of 36% aleoholic potash for two hours on a water bath, and the soap was acidified with 25% sulphuric acid. 71.5 gms of C₁₈ fatty acid (99% of theoretical value) having the constant shown in Table XIV, were obtained.

The iodine value compared with that of free C₁₈-acid is a little smaller. Accordingly 69 gms of the acid dissolved in 690 cc.

acetone, which were cooled first to -20°C and then to -60°C , were fractionated into the following five parts (Table XV) and the amount of stearic, oleic, and linoleic acid were calculated from the iodine value of each part and the mole ratios were shown in Table XVI.

TABLE XV.

Fraction	Weight gm.	Iod. Val.
1	2.4	4.9
2	0.4	7.1
3	47.1	112.2
4	5.0	152.2
5	10.3	160.6
Loss	3.5	

TABLE XVI.

Fatty acid	Weight gm.	Mol. ratio %
Stearic acid	2.8	4
Oleic acid	39.8	61
Linoleic acid	22.6	35

The weight and mole ratio of each fatty acid calculated from the physical constant of acids constituting neutral oil are seen in Table XVII.

TABLE XVII.

Fatty acid	Weight gm.	Mol. ratio %
Miristic acid	3.9	4
Palmitic acid	33.0	30
Stearic acid	3.1	3
Oleic acid	47.9	40
Linoleic acid	27.5	23

When these results are compared with those of free acid (Table XVIII) it was ascertained that in bran-oil there is some difference in the amount of palmitic acid, but in that of other

acids, little or no difference is observed between the free-fatty acids and the fatty acids constituting neutral oil.

TABLE XVIII.

Fatty acid	Fatty acid of	Fatty acid of
	neutral oil	free acid
	Mol. ratio %	Mol. ratio %
Miristic acid	4	2
Palmitic acid	30	19
Stearic acid	3	2
Oleic acid	40	46
Linoleic acid	23	31

EXPERIMENTS.

60 kgs unhulled rice (Showa 15th Year Riku-u No. 132) produced in the Western Chosen farm of the Chosen Fuji Kogyo Company were ground in the laboratory with a Santoku hulling machine and cleaned by a Yamada rice-cleaning machine, and 3.6 kgs bran (6%) were obtained.

2.9 kgs of the bran were treated in a Soxlet's large glass extractor with 4.4 l of petroleum ether (B.P. 40–60°C) for twenty

TABLE XIX.

Sample gm.	0.1 N-KOH cc. F=0.81301	Acid Val.	Mean
0.3937	5.330	73.58	73.58
0.3305	6.350	73.57	
Sample gm.	0.5 N-HCl cc. F=1.2445	Sap. Val.	Mean
1.0073	5.38	186.44	186.79
0.7723	4.14	187.13	
Sample gm.	0.1 N-Na ₂ S ₂ O ₃ cc. F=0.99502	Iod. Val.	Mean
0.1087	8.82	102.45	102.75
0.1205	9.85	103.04	

hours and 600 gms (21%) of a brownish bran-oil of $D_4^{25}=0.9113$; $n_D^{25}=1.4677$ and of Table XIX were obtained.

To 549 gms of the bran-oil which was dissolved in 1.1 l of ether, 770 cc. of 1*N*-potassium hydroxide solution were added. The mixture was thoroughly shaken and the ethereal solution was separated from the soap, washed by water, and dried by adding anhydrous sodium sulphate. The ether was distilled off on a water bath, and 306 gms (56%) of a brownish, transparent neutral oil of $D_4^{25}=0.9201$; $n_D^{25}=1.4708$ and of Table XX were obtained.

TABLE XX.

Sample gm.	0.1 N-Na ₂ S ₂ O ₃ cc. F=0.99502	Iod. Val.	Mean
0.0224	1.84	103.72	103.49
0.0406	3.32	103.25	
Sample gm.	0.5 N-HCl cc. F=1.2445	Sap. Val.	Mean
0.5041	2.66	184.20	184.46
0.3874	2.05	184.72	

25% sulphuric acid was added to the soap solution thus obtained, and the fatty acid was extracted with ether. After washing with water it was dried with anhydrous sodium sulphate, and the ether was distilled off on a water bath. 209 gms (38%) of a greenish brown solid free acid of $D_4^{25}=0.9085$; $n_D^{25}=1.4658$ and of Table XXI were obtained.

TABLE XXI.

Sample gm.	0.1 N-Na ₂ S ₂ O ₃ cc. F=0.99502	Iod. Val.	Mean
0.0451	3.62	101.35	101.57
0.0356	2.87	101.79	
Sample gm.	0.1 N-KOH cc. F=0.81301	Neut. Val.	Mean
0.1657	7.22	198.77	198.38
0.1788	7.76	197.98	

The free acid thus obtained was treated in the following procedure.

500 cc. of methanol containing 2% hydrochloric acid were added to 187 gms of free acid, heated for four hours on a water bath and the alcohol was distilled off. Repeating the same procedure, esterification was made and after the alcohol was distilled, it was neutralized with 2% sodium carbonate solution till the acidity disappeared completely, and was washed with water and dried. 182 gms (93%) of a light brownish transparent crude methyl ester of $D_4^{25}=0.8892$; $n_D^{25}=1.4456$ and of Table XXII were obtained.

TABLE XXII.

Sample gm.	0.1 N-Na ₂ S ₂ O ₈ cc. F=0.99502	Iod. Val.	Mean
0.0267	2.09	98.84	98.93
0.0255	2.00	99.03	
Sample gm.	0.5 N-HCl cc. F=1.2445	Neut. Val.	Mean
0.2479	1.34	188.69	190.06
0.2243	1.23	191.43	

160.8 gms of the methyl ester were distilled fractionally four times and the results of the 4th distillation shown in Table XXIII were obtained.

TABLE XXIII.

	Fraction t°C	Yield gm.	%
1	115—175	1.7	1.2
2	175—193	3.7	2.7
3	193—198	17.5	12.8
4	198—205	12.7	9.1
5	205—216	95.3	69.8
	Residue	4.2	3.2
	Loss	1.7	1.2

The physical constants of the each fraction are shown in Table XXIV.

TABLE XXIV.

	Fraction $t^{\circ}\text{C}$	D_4^{25}	n_D^{25}	Iod. Val.	Sap. Val.
1	115—175	0.8662	1.4421	18.04	220.72
2	175—193	0.8666	1.4423	22.32	205.40
3	193—198	0.8674	1.4425	27.63	204.90
4	198—205	0.8726	1.4481	85.39	191.04
5	205—216	0.8788	1.4521	118.00	189.45

The results of elementary analysis of the 3 and 5 fractions are seen in Table XXV.

60 gms of 36% alcoholic potash were added to 92.7 gms of methyl ester of the fraction 5 which was supposed to be C_{18} -acid. The mixture was heated for two hours on a water bath, and the transparent soap thus obtained was dissolved by adding 1.5 l of hot water, and 25% sulphuric acid was added till the solution became strongly acidic. The liberated acid was separated and heated on the water bath under a reduced pressure, and a yellow transparent mixed fatty acid of $D_4^{25}=0.8947$; $n_D^{25}=1.4610$ and of the analytical results shown in Table XXVI were obtained. The yield was 88 gms (99%).

TABLE XXV.

	Sample gm.	CO_2 gm	H_2O gm	C %	H %
Fraction 3	0.1442	0.3989	0.1643	75.44	12.75
	0.1460	0.4026	0.1615	75.20	12.38
			Mean	75.32	12.59
		Methyl palmitate	$\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$	75.48	12.68
	Sample gm.	CO_2 gm	H_2O gm	C %	H %
Fraction 5	0.1462	0.4129	0.1571	77.02	12.02
	0.1365	0.3862	0.1500	77.16	12.24
			Mean	77.09	12.13
	Methyl stearate	$\text{C}_{19}\text{H}_{38}\text{O}_2$	76.44	12.84	
	Methyl oleate	$\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{O}_2$	76.95	12.24	
		Methyl linoleate	$\text{C}_{19}\text{H}_{34}\text{O}_2$	77.50	11.59

TABLE XXVI.

Sample gm.	0.1 N-Na ₂ S ₂ O ₈ cc. F=0.99502	Iod. Val.	Mean
0.0250	2.46	124.25	124.93
0.0381	3.79	125.60	
Sample gm.	0.1 N-KOH cc. F=0.7880	Sample gm.	Mean
0.2892	13.050	199.52	199.01
0.1126	5.055	198.50	

85.4 gms of C₁₈ acid thus obtained were dissolved in 854 cc. of acetone, and were kept at -20°C for ten hours. The crystals produced were filtered by suction and were washed by 20 cc. of acetone that was cooled to -20°C, and 1.4 gms of crystals and 83.9 gms of liquid were obtained. Their iodine values were found to be 1.5 and 127.2 respectively. The liquid part was again made to 10% acetone solution, and was cooled again to -20°C for five hours. 0.5 gm (Iod. V. 1.8) of the crystals and 83.3 gms. (Iod. V. 128.3) of liquid part were obtained.

The liquid acid thus obtained was made to 10% acetone solution, and was cooled to -60°C by dry ice. The crystals thus produced were filtrated by suction, and were washed by 50 cc. of acetone that was cooled to -60°C. The crystals were dissolved at a room temperature, and 62.5 gms (Iod. V. 114.8) of liquid acid were obtained. When acetone was distilled off from the filtrate, 19.9 gms (Iod. V. 158.6) of liquid acid were obtained.

These procedures were repeated five times and the results are given in Table XXVII.

In the same procedure as in the case of free acid, neutral oil was treated to separate solid and liquid fatty acids. 700 cc. of methyl alcohol, containing 2% hydrogen chloride were added to 206 gms of neutral oil, and it was boiled for six hours on a water bath. The alcohol was thus distilled, and 2% methanol hydrochloric acid was added. Methanolysis was repeated, thus distilling the alcohol off. The solution was shaken with 2% sodium carbonate solution, and was washed with water and dried. 197 gms of a light brownish

TABLE XXVII.

	C ₁₈ free acid 85.4 gms I. V. 124.9 -20°C	
(1)	1.4 gms I. V. 1.5	83.9 gms I. V. 127.2 -20°C
(2)	0.5 gms I. V. 1.8	83.3 gms I. V. 128.3 -60°C
	62.5 gms I. V. 114.8 -60°C	19.9 gms I. V. 158.6 (8)
	51.8 gms I. V. 107.9 -60°C	8.8 gms I. V. 160.4 (7)
	45.0 gms I. V. 105.4 -60°C	5.0 gms I. V. 156.8 (6)
	39.9 gms I. V. 102.0 -60°C	4.0 gms I. V. 146.9 (5)
(3)	34.2 gms I. V. 88.3	4.5 gms I. V. 144.0 (4)

transparent crude methyl ester of $D_4^{25}=0.8958$; $n_D^{25}=1.4570$ and of Table XXVIII were obtained.

152.6 gms methyl ester thus obtained were distilled fractionally four times and the result of the 4th distillation shown in Table XXIX was obtained.

The physical constants of the fractions obtained in the above case are shown in Table XXX.

To 75.6 gms of the methyl ester of the fraction 5 which was supposed to be C₁₈ acid, 45 gms of 36% alcoholic potash were added. After heating for two hours, the soap thus formed was dissolved with 1.3 l of hot water, and was acidified with 25% sulphuric acid.

TABLE XXVIII.

Sample gm.	0.1 N-Na ₂ S ₂ O ₃ cc. F=0.99502	Iod. Val.	Mean
0.0330	2.64	101.01	101.75
0.0223	1.81	102.49	
Sample gm.	0.5 N-HCl cc. F=1.2445	Sap. Val.	Mean
0.2237	1.240	193.50	192.36
0.2696	1.477	191.25	

TABLE XXIX.

	Fraction t°C	Yield gm.	%
1	125—175	1.7	1.3
2	175—193	5.0	3.9
3	193—198	28.5	22.4
4	198—205	6.4	5.0
5	205—216	79.7	62.5
	Residue	4.7	3.7
	Loss	1.5	1.2

TABLE XXX.

	Fraction t°C	D ₄ ²⁵	n _D ²⁵	Iod. Val.	Sap. Val.
1	125—175	0.8625	1.4416	16.74	220.66
2	175—193	0.8660	1.4422	20.03	208.33
3	193—198	0.8687	1.4438	38.40	206.42
4	198—205	0.8729	1.4475	70.61	199.85
5	205—216	0.8788	1.4520	116.51	189.11

The free acid thus separated was washed with water, and the moisture was removed by heating on a water bath. 71.5 gms (99%) of a yellowish-orange transparent C₁₈ mixed fatty acid were obtained and the physical constants of D₄²⁵=0.8960; n_D²⁵=1.4608 and of those shown in Table XXXI were observed.

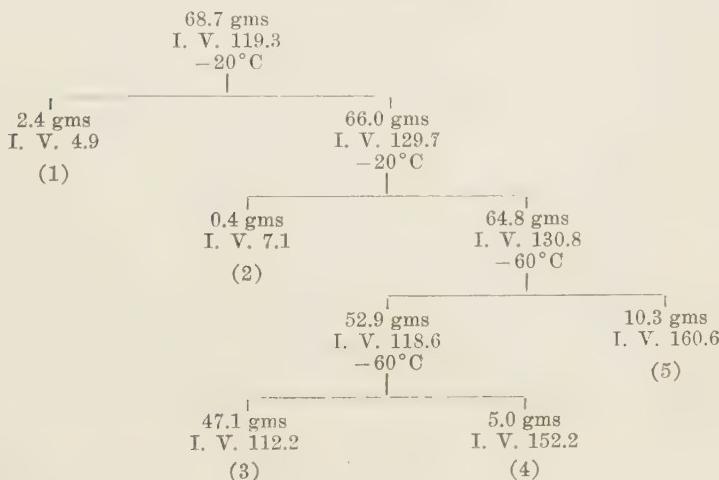
68.7 gms of C₁₈ acid thus obtained were made to 10% acetone

TABLE XXXI.

Sample gm.	0.1 N-Na ₂ S ₂ O ₃ cc. F = 1.0256	Iod. Val.
0.0240	2.20	119.33
Sample gm.	0.1 N-KOH cc. F = 0.7880	Neut. Val.
0.1120	5.037	198.85

solution, and having treated at -20°C , 2.4 gms (I. V. 4.9) of solid acid and 66 gms (I. V. 129.7) of liquid acid were obtained. The liquid acid thus obtained was treated again at -20°C , and 0.4 gms (I. V. 7.1) of solid acid and 64.8 gms (I. V. 130.8) of liquid acid were obtained. Having treated the latter at -60°C , 52.9 gms (I. V. 118.6) of liquid acid from a crystal portion and 10.3 gms (I. V. 160.6) of liquid acid from the filtrate were obtained. The former was again cooled at -60°C , and 47.1 gms (I. V. 112.2) of liquid acid from a crystal portion and 5.0 gms (I. V. 152.2) of liquid acid from the filtrate were obtained (Table XXXII).

TABLE XXXII.

C₁₈ acid constituting neutral oil

I wish to offer my deepest thanks to Prof. S. Komatsu of the Kyoto Imperial University for his kind guidance. I must also sincerely thank Mr. E. Mitsui of the Chosen Fuji Kogyo Company who kindly sent us valuable samples for the research.

REFERENCES.

- Hoshi, T. (1908): J. Soc. Chem. Ind., Japan, **11**, 228.
Tsujimoto, M. (1909): J. Soc. Chem. Ind. Japan, **12**, 297.
Browne, C. A. (1903): J. Am. Chem. Soc., **25**, 948.
Kitamura, S. (1919): J. Soc. Chem. Ind. Japan, **22**, 607.
Takahashi, K. (1919): J. Chem. Soc. Japan, **40**, 191.
Jamieson, G. S. (1932): Vegetable Fat and Oil, **157**.
Hata, C. (1941): J. Soc. Chem. Ind. Japan, **44**, 1079.
Kawase, S., Suda, K. and Fukugawa, A. (1921): J. Chem. Soc. Japan, **42**, 181.
Hiki, O. and Nishikawa, K.: Unpublished.
Komatsu, S. and Yamasaki, S. (1941): J. Chem. Soc. Japan, **62**, 1243.
Haller, M. A. (1908): Compt. Rend., **146**, 259.
Brown, J. B. and Stoner, George G. (1937): J. Am. Chem. Soc., **59**, 3.
Brown, J. B. and Shinowara, G. Y. (1937): J. Am. Chem. Soc., **59**, 6.
Hartsuch, Paul J. (1939): J. Am. Chem. Soc., **61**, 1142.
Masumoto, M. (1941): J. Chem. Soc. Japan, **62**, 547.

ÜBER EINE ISOMERE CHOLSÄURE, HETEROCHOLSÄURE AUS DER ALLIGATORSCHILDKRÖTENGALLE.

VON

TUTOMU KANEMITU.

(*Aus dem Biochemischen Institut Okayama.
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.*)

(Eingegangen am 22. Dezember 1941)

Bereits Yamasaki u. Yuuki (1936) und Yamasaki u. Suganami (1942) haben aus der Galle von Alligatorschildkröten zwei Laktone, Trioxy-sterocholansäurelakton vom Schmelzpunkt 208° u. Trioxy-isosterochoholansäurelakton vom Schmelzpunkt 220° aus der Galle von Alligatorschildkröten isoliert. Das erste Lakton (Fp 208°) habe ich (1942) als δ -Lakton der 3.7.12.22-Tetraoxy-sterocholansäure erkannt.

Aus der von zwei Laktonen befreiten Mutterlauge wurde durch Fraktionierung mit alkalischer Phosphatlösung eine neue Art von Cholsäure vom Schmelzpunkt 195–198° erhalten, die nach der Analyse der Formel $C_{24}H_{40}O_5$ entspricht. Der in Nadeln kristallisierte Methylester schmilzt bei 213–215° und zeigt eine positive Hammarstensche Reaktion und eine spezifische Drehung $[\alpha]_D^{\circ}=+25^\circ$ in Methanol. Der Methylester der neuen Säure zeigt bei der Mischprobe mit dem Tetraoxy-norsterocholansäuremethyl-ester (Ohta 1939) eine Schmelzpunktdepression und zwar schmilzt er bei 190–195°.

Vielleicht ist die Säure auch von Nutria-cholsäure nach Brigi u. Benedict (1933) verschieden, da die erstere eine positive Hammarstensche Reaktion zeigt, die Nutria-cholsäure dagegen nicht, obwohl der Schmelzpunkt der beiden Säuren bei 198° liegt. Diese isomere Cholsäure möchte ich als Heterocholsäure bezeichnen.

Das Vorkommen einer solchen isomeren Cholsäure in der Galle von Alligatorschildkröten kann dafür sprechen, dass diese Säure aus dem als Zwischenstufe der Steroide zu Gallensäure zu

betrachtenden Trioxysterolansäurelakton herstammt, genau wie aus der Krötengalle Tetraoxycholan von der Formel $C_{24}H_{42}O_4$ von Kazuno (1940) aufgefunden wurde.

Als Anhang wurde die haemolytische Grenzkonzentration der verschiedenen Gallensäuren; Cholsäure, Trioxy-isosterocholensäure, Trioxy-sterolansäurelakton und Trioxy-isosterocholansäurelakton festgestellt, wie aus Tabelle I ersichtlich ist.

Trioxylisosterocholensäure ist giftiger als die beiden Laktone und noch weit giftiger als Cholsäure.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

1. *Heterocholsäure.*

2 Liter Galle von Alligotorschildkröten wurden durch Alkohol von Mucin, durch Abdampfen vom Alkohol befreit und mit Kalilauge versetzt, bis die Lösung 10% Kalilauge enthalten mochte. Das Gemisch wurde auf dem Sandbade 50 Stunden erhitzt, unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure mit Chloroform 5 mal geschüttelt, bis der letzte Chloroformauszug sich nicht mehr verfärbte, und der Chloroformauszug mit einer 10%igen Sodalösung geschüttelt, wobei die Säure in die Sodalösung übergehen und das Lakton im Chloroform bleiben sollte.

Diese Sodalösung wurde mit verdünnter Salzsäure angesäuert, die dabei abgeschiedene schmutzig-gelbbraune Fällung in Äther aufgenommen und der Ätherauszug je mit 30 ccm einer 10%igen Natriumphosphatlösung 30 mal extrahiert, um die Säure aufzunehmen.

Diese verhältnismässig nicht schmutzig-gelb gefärbten Fraktionen der Phosphatlösung wurden mit verdünnter Salzsäure angesäuert, die dabei abgeschiedene weisse Fällung wieder in Äther aufgenommen und der Ätherauszug mit einer 10%igen Phosphatlösung wieder einige Male geschüttelt. Diese mittleren Fraktionen wurden unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure in Äther aufgenommen, der Ätherauszug mit Wasser gewaschen, getrocknet und in Petroläther digeriert, um die fettige Substanz zu entfernen. Der Rückstand wurde aus Äther, Essigester, Aceton, Alkohol und

Methanol umkristallisiert, aber immer als amorphes Pulver erhalten, welches bei 195–198° schmilzt.

Diese getrocknete amorphe Masse wurde in Methanol gelöst und in üblicher Weise mit ätherischer Diazomethanlösung verestert. Der Ester wurde aus Methanol-Wasser umkristallisiert. Feine Nadeln vom Schmelzpunkt 213–215°. Ausbeute 0,05 g. Der Ester zeigt eine positive Hammarstensche Reaktion.

Spezifische Drehung: 0,02 g Subst. in 5 cem Methanol,

$$l=1 \text{ dm}, \quad \alpha = +0,1 \quad [\alpha]_D^{20} = +25^\circ$$

1,945 mg Subst.: 5,077 mg CO₂, 1,750 mg H₂O.

C₂₅H₄₂O₅ Ber. C 71,04% H 10,00%

Gef. „ 71,20 „ „ 10,07 „

Der Ester wurde mit einer 5%igen alkoholischen Kalilauge 2 Stunden hydrolysiert und aus dem Hydrolysat durch Ansäuren mit verdünnter Salzsäure eine weisse Fällung erhalten. Diese Masse wurde nach dem Trocknen aus Aceton, Essigester, Methanol und Äthanol umkristallisiert, aber kein Kristall sondern eine amorphe Substanz erhalten, die bei 195–198° schmilzt.

2. Hämolysische Wirkung.

Die hämolysische Wirkung der höheren verschiedenen Gallensäuren, wie Trioxy-sterocholansäurelakton, Trioxy-isosterochoholansäurelakton und Trioxy-isosterocholeinsäure, wurde nach der

TABELLE I.

Konzentration	1 37,5	1 75	1 150	1 300	1 600	1 1200	1 2400	1 4800
Gallensäure	++	++	+	+	±	—	—	—
Cholsäure	—	—	—	—	—	—	—	—
Trioxo-isostero- cholensäure	++	++	++	++	+	+	±	—
Trioxo-sterocholan- säurelakton	++	++	++	+	+	±	—	—
Trioxo-isostero- cholansäurelakton	++	++	++	+	+	±	—	—

Methode von Wieland (1920) geprüft und mit der von Cholsäure verglichen, wobei das Lakton durch Alkali hydrolysiert und als Natriumsalzlösung in 0,9%iger Kochsalzlösung zum Versuch verwendet wurde. Die roten Blutkörperchen wurden Ziegenblut entnommen. Die Resultate sind in Tabelle I zusammengefasst.

LITERATUR.

- Brigl, P. u. Benedict, O. (1933): *Z. Physiol. Chem.*, **220**, 106.
Kazuno, T. (1940): *Z. Physiol. Chem.*, **266**, 11.
Ohta, K. (1939): *Z. Physiol. Chem.*, **259**, 53.
Wieland, H. (1920): *Arch. exp. Path. u. Pharmak.*, **86**, 79.
Yamasaki, K. u. Yuuki, M. (1936): *Z. Physiol. Chem.*, **244**, 173.
Yamasaki, K. u. Suganami, T. (1942): *Jl. of Bioch.*, **35**, 233.

BILDUNG VON α - UND β -3-OXY-7-KETOCHOLANSÄURE
AUS DEHYDROCHENODESOXYCHOLSÄURE
IM KRÖTENORGANISMUS.

VON
TUTOMU KANEMITU.

(*Aus dem Biochemischen Institut Okayama.
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.*)

(Eingegangen am 22. Dezember 1941)

Die Epimerisierung der Alkoholgruppe in der Stellung an C₃ des Gallensäuremoleküls im Organismus wurde bei verschiedenen Ketogallensäuren festgestellt, wie z. B. Shibuya (1933) u. Kyogoku u. Yamasaki (1935) durch Zufuhr von Dehydrocholsäure aus dem Harn des Krötenorganismus β -3-Oxy-7,12-diketocholansäure und Kyogoku (1937) durch Zufuhr von Dehydrodesoxycholsäure β -3-Oxy-12-ketocholansäure mit der α -Säure isoliert haben. Andrerseits hat Kimura (1937) in der Schweinegalle β -3- α -6-Dioxycholansäure, β -Hyodesoxycholsäure aufgefunden.

Ausserdem wurde noch β -3- α -6-Dioxyallocholansäure im Harn von Kaninchen bei Zufuhr von β -Dehydrohyodesoxycholsäure aufgefunden, während eine partiell hydrierte β -3-Oxy-6-ketoallocholansäure von Tukamoto (1939) aus dem Harn der Kröten erhalten wurde, denen α -Dehydrohyodesoxycholsäure einverleibt wurde. Tukamoto (1939) hat dabei auch die interessante Beobachtung gemacht, dass die dem Kaninchenorganismus verabreichte α -3-Oxy-6-ketocholansäure unter Epimerisierung als β -3-Oxy-6-ketoallocholansäure im Harn ausgeschieden wurde, was mit dem Ergebnis von Kyogoku (1937) übereinstimmt.

Bis jetzt wurde nur das Schicksal der 3,12-, 3,6-Diketo- oder 3,7,12-Triketogallensäure untersucht.

Um einen weiteren Beitrag zur Kenntnis des Schicksals der Ketogallensäure im Tierkörper zu bekommen, wurden hier 35 g 3,7-Diketocholansäure den 126 Kröten subkutan einverlebt und aus 9,4 Liter Harn 0,05 g β -3-Oxy-7-ketocholansäure vom Schmelz-

punkt 247–248° und aus 252 ccm Galle 0,04 g α -3-Oxy-7-ketocholansäure vom Schmelzpunkt 201° erhalten, die beide durch Oxydation mit Chromsäure 3.7-Diketocholansäure lieferten.

Die aus dem Harn gewonnene Säure vom Schmelzpunkt 248° wurde in bekannte 3,7-Diketocholansäure vom Schmelzpunkt 154° oxydiert und in bekannten Äthylester vom Schmelzpunkt 133° übergeführt, was zeigt, dass die OH-Gruppe an C₃ als die β -Konfiguration zu bezeichnen ist, das heisst die Säure β -3-Oxy-7-ketocholansäure ist.

Diese Säure muss ohne Zweifel von der verabreichten Dehydrochenodesoxycholsäure herstammen, was für die Epimerisierung der Alkoholgruppe in der Stellung an C₃ des 3,7-Diketocholansäuremoleküls im Tierkörper beweiskräftig sein soll, während die verabreichte Diketosäure der Hauptmenge nach im Krötenorganismus in α -3,7-Dioxycholansäure umgewandelt und ausgenutzt worden sein dürfte.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Den Kröten wurde Dehydrochenodesoxycholsäure als 1%ige Natriumsalzlösung je 3 ccm subkutan verabreicht und zwar betrug die injizierte Gallensäure insgesamt 35 g und die Krötenzahl 126. Dann wurde nach Zufuhr von Dehydrochenodesoxycholsäure der Harn der Kröten durch Katheterisierung gesammelt, der insgesamt 9,4 Liter betrug. Nach 5–6 maliger Injektion wurden die Kröten (insgesamt 126) getötet und ihre Gallenblasen herausgenommen. Die gesammelte Gallenmenge betrug 252 ccm.

I. Galle.

Die Galle wurde durch Alkohol von Mucin befreit, der Alkohol abgedampft und mit Äther geschüttelt, wodurch die Lösung in zwei Fraktionen, Ätherauszug und wässerige Lösung getrennt wurde.

1. Ätherauszug.

Der Ätherauszug wurde mit einer 10%igen Sodalösung geschüttelt, die Sodalösung unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgefällt und die Fällung wieder in Äther aufgenommen.

Dieser Ätherauszug wurde nach dem Waschen mit Wasser und Trocknen mit Pottasche verdunstet und in Petroläther digeriert, um die fettige Substanz zu entfernen. Dieser Rückstand wurde erst aus Äther, dann aus Methanol-Wasser umkristallisiert. Tafeln vom Schmelzpunkt 200–201°. Ausbeute 0,04 g. Der Krystall zeigt mit 3-Oxy-7-ketocholansäure keine Schmelzpunktdepression.

3,550 mg Subst.: 9,572 mg CO₂, 3,083 mg H₂O.

C ₂₁ H ₃₈ O ₁	Ber. C 73,79	H 9,81
„	Gef. „ 73,53	„ 9,72

2. Wässrige Lösung.

Die von der Ätherlösung abgetrennte wässrige Lösung wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure mit Äther ausgezogen, der Ätherauszug mit einer 10%igen Sodalösung geschüttelt und die Sodalösung unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgefällt. Die Fällung wurde wieder in Äther aufgenommen, der Ätherauszug nach dem Waschen mit Wasser und Trocknen mit Pottasche verdunstet und der Rückstand in Petroläther digeriert, um die fettige Substanz zu beseitigen. Die dabei erhaltene gelbgefärbte harzige Masse wurde aus Essigäther mehrmals umkristallisiert, wobei immer eine nicht krystallisierte kolloidige Masse zurückblieb. Dies dürfte wohl eine Art von Sterocholansäure sein.

II. Harn.

Der gesammelte Harn wurde mittelst des elektrischen Föhns getrocknet, wieder im Exsicator gut getrocknet und der Rückstand (34 g) mit absolutem Alkohol viermal extrahiert. Vom Alkoholauszug (3 Liter) wurde unter Zusatz von Wasser der Alkohol abgedampft und unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgeäthert. Der Ätherauszug wurde nach dem Waschen mit Wasser und Trocknen mit Pottasche verdampft und in Petroläther digeriert, um das Pech zu entfernen. Der Rückstand wurde in Äther digeriert und in eine ätherlösliche und ätherunlösliche Fraktion getrennt.

1. Ätherlösliche Fraktion.

Der Ätherauszug wurde verdunstet, in 5%iger Kalilauge gelöst

gelöst und eine Stunde lang erwärmt. Das Hydrolysat wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgefällt, die Fällung in Äther aufgenommen, der Ätherauszug nach dem Waschen mit Wasser und Trocknen mit Pottasche aus Aceton-Wasser umkristallisiert. Schuppen vom Schmelzpunkt 247–248°. Ausbeute 0,05 g.

2,805 mg Subst.: 7,643 mg CO₂, 2,483 mg H₂O.

C ₂₄ H ₃₈ O ₄	Ber. C 73,79	H 9,81
	Gef. „ 73,50	„ 9,89.

40 mg der Säure vom Schmelzpunkt 247–248° wurden in 5 ccm Eisessig gelöst, mit 40 mg Chromsäure in Eisessig versetzt und eine Stunde stehen gelassen. Die Lösung wurde in Wasser eingegossen und die dabei abgeschiedene Fällung aus Alkohol-Wasser umkristallisiert. Schuppen vom Schmelzpunkt 153–154°. Der Krystall zeigt mit reiner 3,7-Diketocholansäure keine Schmelzpunktdepression.

Diese Säure vom Schmelzpunkt 154° wurde in üblicher Weise mit Alkohol und konzentrierter Schwefelsäure verestert und der Ester aus Alkohol umkristallisiert. Nadeln vom Schmelzpunkt 133°.

Die Säure zeigt mit dem Dehydrochenodesoxycholsäure-äthylester keine Schmelzpunktdepression.

3,530 mg Subst.: 9,712 mg CO₂, 3,013 mg H₂O.

C ₂₀ H ₄₀ O ₄	Ber. C 74,95	H 9,68
	Gef. „ 75,04	„ 9,55.

2. Ätherunlösliche Fraktion.

Die ätherunlösliche Masse wurde in einer 5%igen Kalilaugelösung gelöst und 2 Stunden lang erhitzt. Das Hydrolysat wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgefällt. Die Fällung wurde in Essigester gelöst und die Lösung nach dem Waschen mit Wasser und Trocknen eingeengt, wobei aber kein Krystall erhalten wurde. Dann wurde der Rückstand aus Aceton, Methanol und Äthanol mehrmals umzukristallisieren versucht, konnte aber nicht in Krystallform gebracht werden.

LITERATUR.

- Kyogoku, K. u. Yamasaki, K. (1935): Z. Physiol. Chem., **235**, 43.
Kyogoku, K. (1937): Z. Physiol. Chem., **246**, 99.
Miyazi, S. (1938): Z. Physiol. Chem., **254**, 104.
Shibuya, S. (1933): J. of Bioch., **17**, 385.
Tukamoto, M. (1939): Z. Physiol. Chem., **260**, 210; J. of Bioch., **30**, 337.

ÜBER DIE VERTEILUNG DES VITAMIN B₁ IN TIERISCHEN UND PFLANZLICHEN GEWEBEN. II.¹⁾

VON

KEIZABURO DOHI.

(Aus dem Biochemischen Laboratorium des Kitasato-Instituts
zu Tokyo. Direktor: Dr. A. Fujita.)

(Eingegangen am 25. Dezember 1941)

In Fortsetzung der ersten Mitteilung (Fujita und Matsukawa 1942) wurde ausschliesslich durch unsere fluorometrische Methode (Fujita, Asari und Dohi 1942) die Verteilung des Aneurins in verschiedenen tierischen und pflanzlichen Geweben bestimmt. Da die fluorometrische Methode etwa 50 bis 100 mal empfindlicher als die kolorimetrische ist, wurde die Verteilung des Aneurins in einzelnen feineren Gewebeteilen und in kleineren Organen immer fluorometrisch erforscht. Auch die untersuchten Arten der Tiere und Pflanzen wurden erweitert. In dieser Arbeit sollen die Ergebnisse der Messungen an tierischen Geweben berichtet werden.

I. ANEURINGEHALTE DER RATTEMORGANE.

Die Organe wurden sofort nach dem Töten der Ratte herausgenommen und abgewogen, die Gewebephosphatase wurde sofort inaktiviert und vorschriftsmässig bestimmt. Die Ergebnisse befinden sich in Tabelle I, in der die Organe der Ratte mit dem gleichen Buchstaben sich auf dieselbe Ratte beziehen. Da der Aneuringehalt der Organe je nach dem Individuum, Ernährungszustand, usw. sehr variabel ist, sollen die angegebenen Werte nur als angennährt betrachtet werden. Aus der Tabelle ersieht man, dass das Aneurin in den meisten frischen Geweben fast ausschliess-

1) Der Gesellschaft „Nippon Gakuzyutu-Sinkōkai“ danke ich für die Unterstützung dieser Arbeit. (A. Fujita).

TABELLE I.

Rattenorgane.

Die mit [] eingeklammerten Zahlen bedeuten die Aneurinwerte der Gewebebreie, die ohne Erhitzung und ohne „Takadiastase“-Zusatz nach Bebrütung über Nacht bestimmt wurden.

Datum	Nummer d.Ratte	Gewebe	Aneuringehalt in γ%		frei insgesamt (%)	Bemerkungen
			frei	insgesamt		
30. Nov. 1941	F	Nebenniere ¹⁾	fast 0	867	0	
30. Sept. „	A	Herzmuskel	”	678 [675]	0	
13. Oct. „	B	Hoden	36,2	735 [744]	5	
10. Nov. „	E	Knochenmark	—	660	—	
30. Sept. „	A	Niere	23,7	625 [623]	4	
13. Okt. „	B	Leber	38,7	600 [588]	6,5	
„ „ „	B	Skelettmuskel (Oberschenkel)	fast 0	561 [586]	0	2. ²⁾
18. Okt. „	C	Milz	fast 0	512 [482]	0	
18. Okt. „	D	Grosshirn	fast 0	463 [456]	0	
„ „ „	C	Thymus ¹⁾	67,9	456	15	
13. Okt. „	B	Gehirn (Gross- u. Kleinhirn)	fast 0	411 [350]	0	
30. Nov. „	F	Magen	fast 0	378	0	
10. Nov. 1941	E	Zunge	—	360	—	
18. Okt. „	D	Zwerchfell ¹⁾	36,1	317	11	
30. Sept. „	A	Lunge	fast 0	275 [270]	0	
30. Nov. „	F	Kleinhirn ¹⁾	fast 0	265	0	
30. Nov. „	F	Dünndarm ¹⁾	10,7	253 [253]	4	
30. Nov. „	F	Dickdarm ¹⁾	fast 0	253	0	
10. Nov. „	E	Parotis	—	227	—	
18. Okt. „	C	Pankreas ¹⁾	37,5	181	21	
10. Nov. „	E	Augapfel	—	107	—	
10. Nov. „	E	Haut	fast 0	96,5	0	
18. Okt. „	C	Uterus	fast 0	60,2 [66]	0	

¹⁾ Sofort nach dem Töten bestimmt.

²⁾ Zweimalige Vorextraktionen.

lich in veresterter Form vorliegt. Das etwa gefundene geringe freie Aneurin stammt möglicherweise von der Dephosphorylierung durch Gewebephosphatase während der Präparation her. Ferner erkennt man, dass die meisten Gewebe eine genügende Menge Phosphatase enthalten und das sämtliche veresterte Aneurin durch Gewebephosphatase allein ohne besonderen Zusatz der „Takadiastase“ nach Bebrütung hydrolysiert wird. Besonders reich an Aneurin sind folgende Gewebe: Nebenniere, Herzmuskel, Hoden, Knochenmark, Niere, Leber, Skelettmuskel, Milz, Gehirn und Thymus.

II. ANEURINGEHALTE DER RINDERORGANE.

TABELLE II.

Rinderorgane.

Datum	Gewebe	Aneuringehalt in %		frei insgesamt (%)	Bemerkungen
		frei	insgesamt		
20. Nov. 1941	Nebenniere, Rinde	fast 0 ¹⁾	fast 0 ¹⁾	—	
” ” ”	” Mark	fast 0 ¹⁾	750	0	
17. Feb. 1940	Herzmuskel	50*	500	10*	
25. Feb. ”	Niere, Rinde	260*	520	50*	
28. Feb. ”	” Mark	180*	200	90*	
20. Juli 1941	Retina	84,2*	438	19*	1. w. ⁴⁾
21. Juli ”	Chorioidea	268*	301	89*	” ”
24. Juli ”	Iris	48,7*	101	48*	” ”
20. Juli ”	Hornhaut	42,2*	43,3	100*	” ”
25. Juli ”	Linse	8,9*	15,8	56*	
20. Juli ”	Glaskörper ²⁾	—	9	—	
18. Feb. ”	Milch ³⁾	27,8*	31,6	88*	
15. Feb. ”	” ³⁾	23,1*	44,3	52*	
21. Feb. ”	” ³⁾	26,0*	42,1	62*	

* Ohne Berücksichtigung der Phosphatase-Inaktivierung bestimmt. Dasselbe ist auch für die folgenden Tabellen gültig.

¹⁾ Das zugesetzte Aneurin wurde vollständig wiedergefunden.

²⁾ Von S. Kawati bestimmt.

³⁾ Von T. Asari bestimmt.

⁴⁾ Es bedeutet: Einmal vorextrahiert. Die Fluorescenz ist weiss.

Von Rinderorganen wurden hauptsächlich die Verteilung des Aneurins in einzelnen feineren Gewebeteilen untersucht, wie z. B. in Rinde und Mark von Niere und Nebenniere, sowie in einzelnen Bestandteilen des Augapfels. Wie aus den Ergebnissen in Tabelle II ersichtlich, findet man das Aneurin bei Nebenniere hauptsächlich im Mark, während in der Rinde der Niere etwa 2,5 mal so viel enthalten ist als im Mark. Das Auge enthält am meisten Aneurin in der Netzhaut, während es in der Linse sehr spärlich zu finden ist. Betreffs Glutathion und Vitamin C haben wir (Fujita und Numata 1939, Fujita und Ebihara 1937) ein gerade umgekehrtes Verhältnis gefunden. Aus dem Reichtum an Aneurin in der Netzhaut ist anzunehmen, dass das Aneurin bei der Sehfunktion irgend eine wichtige Rolle spielt.

III. ANEURINGEHALTE EINIGER MENSCHLICHER GEWEBE UND KÖRPERFLÜSSIGKEITEN.

Ich untersuchte einige menschliche Gewebe und Körperflüssigkeiten, die durch klinische Operation entnommen waren. Die Ergebnisse enthält Tabelle III. Die Frage ob irgend ein Zusammenhang zwischen der Arakawaschen Reaktion und dem Aneuringehalt der Milch besteht, hat schon Asari (1942) ausführlich behandelt.

TABELLE III.

Menschengewebe.

Datum	Gewebe	Krankheit	Aneuringehalt in γ%		frei insgesamt (%)	Bemerkungen
			frei	insgesamt		
19. Juli 1941	Tonsilla palatina ^{a)}	Tonsillitis	20*	90	22*	1.
20. Juli „	Schleimhaut d. Sinus Maxillaris Highmori	Chron. Entzündung	48*	76	63*	1.
26. Juni „	Liq. cerebro-spinalis	Bronchitis (5 jähr. Kind)	2,8	9,3	30	1 g. gr. ^{b)}

^{a)} Von S. Kawati bestimmt.^{b)} Einmalige Vorextraktion. Gelbgrüne Fluoreszenz.

IV. ANEURINGEHALTE DER GEWEBE SONSTIGER
SÄUGETIERE UND VÖGEL.

Aus Tabelle IV ersieht man, dass der Muskel des Schweines besonders reich an Aneurin ist. Im Hühnerei ist das Aneurin besonders reichlich im Eiklar enthalten und zwar rund 10 mal so viel als im Eigelb.

TABELLE IV.
Gewebe der sonstigen Säugetiere und Vögel.

Datum	Art	Gewebe	Aneuringehalt in γ%		frei insgesamt (%)	Bemerkungen
			frei	insgesamt		
2. März 1942	Schwein	Muskel	890	1975 [1975]	45	3.
3. Juli „	„	“	—	1380	—	2. b.
2. März „	„	Fett	17	66 [17]	26	3.
5. März „	Huhn	Muskel	—	116	—	2.
24. Feb. „	„	{ Eigelb Eiklar	—	51	—	3.
14. Mai „	Anas platyrhyncha platyrhyncha (Kamo)		—	485	—	3.
		Muskel	—	263	—	2. gr. w

V. ANEURINGEHALTE DER FISCHE.

In Tabelle V werden die Ergebnisse der Messungen an verschiedenen Fischarten angeführt. Hier kann man ganz eindeutig erkennen, dass das Aneurin auch in Fischgeweben fast ausschliesslich in veresterter Form vorliegt. Sehr auffallend ist der Befund, dass der dunkelrote Muskel „Tiai“ im Vergleich zum gewöhnlichen Muskel bedeutend viel Aneurin enthält, wie in der ersten Mitteilung bereits hervorgehoben wurde. Merkwürdig ist der Befund, dass die meisten Fischgewebe nach Zerreiben ohne Erhitzung und nach Bebrüten über Nacht ohne Zusatz der „Takadiastase“ kein Aneurin nachweisen lassen, obwohl das zugesetzte Aneurin vollkommen wiedergefunden wird, wie die eingeklammerten Zahlen in Tabelle V zeigen. Die Fischgewebe scheinen also praktisch keine Phosphatase zu enthalten, die das

TABELLE V.

Fische.

Datum	Art	Gewebe	Aneurinengehalt in %		frei insge- samt (%)	Bemer- kungen
			frei	insgesamt		
11. Mai 1942	Pagrosomus major Temm. et Schleg. (Madai)	Muskel	—	522	—	1. b. ⁴ w. ⁵)
12. Dez. 1941	Parasilurus asotus L. (Namazu) ⁶)	Muskel	0 ³)	425 [0] ³)	0	
		Leber	0 ³)	375 [0] ³)	0	
		Haut	0 ³)	20 [0] ³)	0	
4. Dez. "	Cyprinus carpio L. (Koi) ⁶)	Weisser Muskel	0 ³)	413 [0] ³)	0	
		„Tiai“	0 ³)	3250 [0] ³)	0	
		Hoden	0 ³)	101 ³) [0] ²)	0	
		Leber	0 ³)	883 ³) [0] ³)	0	
		Haut	0 ³)	01 ¹) [0] ¹)	0	
4. Dez. "	Carassius carassius L. (Huna) ⁶)	Weisser Muskel	0 ³)	375 [0] ³)	0	
		„Tiai“	0 ³)	2425 [0] ³)	0	
		Ovarium	0 ³)	263 [0] ³)	0	
		Hoden	0 ³)	67 [0] ³)	0	
		Leber	0 ³)	99 [0] ³)	0	
9. Juli 1942	Neothunnus macropterus Temm. et Schleg. (Sibi)	Haut	0 ³)	03 ³) [0] ³)	0	
		Muskel (rot)	—	155	—	2. b. gr. ⁶)
		„Tiai“	—	297	—	2. b. gr.
9. Juli "	Germo germo Lacepede (Binnaga)	Muskel (weiss)	—	146	—	2. b. gr.
		„Tiai“	—	844	—	2. b. gr.
19. Mai 1942	Trachurus japonicus Temm. et Schleg. (Azi)	Muskel	—	137 ³)	—	2. gr. b.w.
15. Jan. "	Beryx splendens Lowe (Kimmiedai)	Muskel (haupsächl. weiss)	7	131	5	
4. Dez. 1941	Hemibarbus barbus Temm. et Schleg. (Nigoi)	Muskel	0 ³)	89 ³) [0] ³)	0	
		Haut	0 ³)	03 ³) [0] ¹)	—	
6. Juni 1942	Stromateoides argenteus Euphrasen (Managatuo)	Muskel	—	88	—	2. gr. b.
		„Tiai“	—	113	—	2. gr. b.
		Haut (weiss, Bauchseite)	—	69	—	2. b.
23. Juni "	Psenopsis anomala Temm. et Schleg. (Ibodai)	Muskel (einschl. „Tiai“)	—	84	—	1. b.

4. Mai	1942	Katsuwonus vagans Lesson (Katuo)	{	Roter Muskel „Tiai“	—	78	—	3. b. w.
		823						1. b. w.
9. Mai	„	Caesio chry- sozona Kuhl et Van Hasselt (Takusago)		Muskel	—	78	—	1. b. w.
11. Juni	„	Oncorhynchus keta Walbaum (Sake)	{	Roter Muskel „Tiai“ (grau- braun)	—	68	—	2. b. gr.
		Haut		—	145	—		2. b. gr.
7. Mai	„	Platycephalus indicus L. (Koti)		Muskel	—	10	—	2. b. gr.
					66	—		2. b. w.
9. Mai	„	Limanda angus- tirostris Ki- tahara (Karei)		Muskel	—	61	—	1. b. w.
7. Mai	„	Seriola quinque- radiata Temm. et Schleg. (Buri)	{	Roter Muskel „Tiai“	—	53	—	2. b. w.
				—	320	—		2. b. w.
28. Mai	„	Scomerus japonicus Houttuyn (Saba)	{	Muskel „Tiai“	—	53	—	2. b. w.
				Haut (Rücken- seite) mit etwas „Tiai“	—	384	—	4. gr.
27. Mai	„	Ophiocephalus argus Cantor (Raihi)	{	Muskel Haut	—	156	—	2. gr. w.
				—	50 ³⁾	—		2. b. w.
11. Juni	„	Thalassoma um- brostigma Rüppel (Nisikuio)		Muskel	—	34 ³⁾	—	2. gr. w.
					49 ³⁾	—		2. b.
27. Mai	„	Muraenesox cinereus Fors- kal (Hamo)		Muskel (ausschl. Haut)	—	47	—	2. b. w.
30. April	„	Brachiotegus japonicus Houttuyn (Amadai)	{	Muskel Haut mit etwas „Tiai“	—	47	—	2. b. w.
				49	49 [48]	100		2. b. w.
11. Juni	„	Paralichthys olivaceus Temm. et Schleg. (Hirame)	{	Muskel Haut (weiss) mit etwas „Tiai“	—	39	—	2. b.
				—	37	—		2. b. gr.
7. Mai	„	Gadus macro- cephalus Tilesius (Tara)		Muskel	—	39 ³⁾	—	2. b.
3. Juli	1942	Thynnus ori- entalis Temm.	{	„Tiai“	—	316	—	2. gr. b.
6. Juni	„	et Schleg. (Maguro)	{	Muskel (Rückenseite)	—	38	—	2. b.
“ ”	“ ”			Haut	—	9	—	2. b.
2. Mai	„	Sebastodes matsu- baraë Hilgendorf (Akôdai)		Muskel	—	34	—	2. gr.

		Monacanthus cirrifer Temm. et Schleg. (Kawahagi)	Muskel „Tiai“ Leber	— — —	32 192 89	— — —	2. b. w. 2. b. w. 2. b. w.
2. Juni	„	Polypus vulgaris Lamarck (Tako)	Arm (ausschl. Haut)	—	26	—	1. b. w.
11. Mai	„	Sepiella maindroni de Rochebrune. (Maika)	Arm Rumpf	— —	10 10	— —	1. b. w. 1. b. w.
14. Mai	„	Clupea pallasii Cuvier et Valenc. (Nisin)	Muskel Ovarium „Kazunoko“	— — —	5,3 6,5	— —	1. b. gr. w. 3. b. w.
2. Juni	„	Sardinia melanosticta Temm. et Schleg. (Iwasi)	Muskel „Tiai“ Haut	— — —	4,8 5,1 0	— — —	2. gr. 2. gr. 2. gr. b.
12. Dez.	1941	Anguilla japonica Temm. et Schleg. (Unagi) ^①	Muskel Leber Haut	(0 ³) (0 ³) (0 ³)	0 ³ [0] ³ 313 ³ [0] ³ 0 ³ [0] ³	— 0 —	— — —
6. März	1942	Misgurnus anguilllicaudatus Cantor (Dozyô) ^②	Ganzes Muskel	— —	0 ³ 0 ³	— —	3. v. ^③ 3. d. ^④ v.
23. Mai	„	Cyprinodon agoo Temm. et Schleg. (Tobio)	Muskel „Tiai“	— —	(0) ² (0) ²	— —	2. gr. w. 2. gr. w.

^① Kein zugesetztes Aneurin wurde wiedergefunden.

^② Zugesetztes Aneurin wurde nur teilweise wiedergefunden.

^③ Das zugesetzte Aneurin wurde praktisch vollständig wiedergefunden.

^④ b. blau. ^⑤ w.: weiss. ^⑥ gr.: grün. ^⑦ v.: violett. ^⑧ d.: dunkel.

^⑨ Sofort nach dem Töten untersucht.

veresterte Aneurin hydrolysiert kann. Sehr merkwürdig waren die Befunde bei der Haut von „Koi“ und „Nigoi“, (nicht aber bei Haut von „Namazu“, „Unagi“ und „Dozyô“), wo das dem unerhitzten Gewebebrei zugesetzte Aneurin nach Bebrüten über Nacht verschwindet, während das bei der Bestimmung des Gesamtaneurins dem erhitzten Extrakt zugesetzte Aneurin vollkommen wiedergefunden wird. Es liegt sehr nahe anzunehmen, dass sich irgend eine thermolabile Substanz in solchen Geweben befindet, die das Aneurin zerstört. Einige Versuchsbeispiele sollen hier angegeben werden.

(1) Weisser Muskel von „Huna“ (*Carassius carassius L.*)

5,74 g Muskel werden behandelt. 10 ecm Extrakt (1:20) werden

zur Bestimmung des Gesamtaneurins verwendet. Zur Thiochromreaktion werden 6,0 ccm Isobutanol zugesetzt. Die Fluoreszenz war etwas zu stark. Zur Bestimmung wurde der Isobutanolextrakt mit Isobutanol aufs 4fache verdünnt und 5,0 ccm der verdünnten Lösung wurden verwendet. Gefunden:

$H=0,337$, $Z=0,437$, $Z-H=0,100$ (Auf 6,0 ccm unverdünntem Isobutanolextrakt umgerechnet: $0,10 \cdot 4 \cdot 6/5=0,48\gamma$. Zugesetzt: $0,50\gamma$).

$$X = 4 \cdot 0,337 \cdot \frac{0,5}{4 \cdot 0,1} \cdot \frac{20}{10} \cdot 100 = 375\gamma\%.$$

Zur Bestimmung des freien Aneurins werden 10 ccm Extrakt (1:20) verwendet. Gefunden:

$$H=0, Z=0,415. \text{ Also } x=0.$$

2) Das „Tiai“ von „Huna“.

1,020 g Muskel werden behandelt. 2,0 ccm Extrakt (1:50) werden zur Bestimmung des Gesamtaneurins verwendet. Von 6,0 ccm zugesetztem Isobutanol werden zur Bestimmung 5,0 ccm Isobutanolextrakt verwendet. Gefunden:

$H=0,825$, $Z=0,425$, $Z-H=0,425$ (Auf 6,0 ccm Isobutanol umgerechnet: $0,510\gamma$. Zugesetzt: $0,500\gamma$).

$$X = 0,825 \cdot \frac{0,5}{0,425} \cdot \frac{50}{2} \cdot 100 = 2425\gamma\%.$$

Zur Bestimmung des freien Aneurins wurden 10 ccm Extrakt (1:50) verwendet. Gefunden:

$$H=0, Z=0,415. \text{ Also } x=0.$$

(3) Haut von „Huna“*.

2,080 g Haut werden behandelt. 10 ccm Extrakt (1:50) werden zur Bestimmung des Gesamtaneurins verwendet. Gefunden:

$H=0$, $Z=0,415$, $Z-H=0,415$ (Auf 6,0 ccm Isobutanol umgerechnet: $0,498\gamma$. Zugesetzt: $0,500\gamma$). Also $X=0$.

VI. ANEURINGEHALTE IN KREBSEN, KRABBEN UND MUSCHELN.

In Tabelle VI befinden sich die Ergebnisse für Krebse,

Krabben und Muscheln. Man erkennt daraus deutlich, dass kein freies Aneurin, mit einigen Ausnahmen wie „Syako“ und „Kaki“, nachzuweisen ist und dass das dem unerhitzten Brei zugesetzte Aneurin nach Bebrütung über Nacht meistenfalls vollständig verschwindet und in einigen Fällen wie z. B. „Syako“ und „Sazae“ grösstenteils verloren geht, obwohl das dem erhitzten Extrakt zugesetzte Aneurin nach Bebrütung mit „Takadiastase“ meisten-

TABELLE VI.
Krebse, Krabben und Muscheln.

Datum	Art	Gewebe	Aneuringehalt in %		frei insge- sammt (%)	Bemer- kungen
			frei	insgesamt		
26. Dez. 1941	Caridina japonica Ortmann (Kawaebi)	Ganzes (ausschl. Schale)	0 ³⁾	(160) ²⁾ [0] ¹⁾	0	
24. Jan. 1942	Squilla oratoria de Haan (Syako)	Ganzes (ausschl. Schale)	109 ³⁾	115 ³⁾ [156 [?]] ²⁾	95	
12. Nov. ,	Portunus trituberculatus Miers (Gazami)	(Muskel Leber	0 ³⁾ 0 ³⁾	126 ³⁾ [0] 92 ³⁾ [0]	0 0	1.
6. Juni ,	Cambaroides japonicus de Haan (Zarigani)	Muskel (ausschl. Kopf und Schale)	—	101 ³⁾	—	2. b.
2. Mai ,	Penaeopsis joyneri Miers (Sibaebi)	Muskel	—	66 ³⁾ [17] ³⁾	—	2. b.
11. Feb. ,	Panulirus japonicus de Haan (Iseebi)	Muskel	0 ³⁾	13 ³⁾	0	
10. Juli 1941	Penaeus japonicus Bate (Kurumaebi) ³⁾	Ganzes (ausschl. Schale)	(0) ¹⁾	(0) ¹⁾	—	3. b. v.
24. Jan. 1942	Stichopus japonicus Selenka (Namako)	Ganzes (ausschl. Eingeweide)	0 ³⁾	11 ³⁾ [0] ²⁾	0	
16. Feb. ,	Atrina japonica Rceve (Tairagi)	{Adduktor Ftss	0 ³⁾ (0) ¹⁾	600 ³⁾ [0] ¹⁾ 213 ³⁾ [0] ¹⁾	0 0	
18. Nov. 1941	Ostrea laperousei Thunberg (Kaki) ³⁾	{Kiemen Adduktor Sonstige	206 ³⁾ 156 ³⁾ 61 ³⁾	525 ³⁾ [475] ³⁾ 263 ³⁾ [129] ³⁾ 288 ³⁾ [40] ³⁾	39 60 21	

14. Mai 1942	<i>Haliothis gigantea</i> Gmelin (Awabi)	Muskel	—	182 ³⁾ [47] ³⁾	—	2. gr.w.
4. Mai „	<i>Latrunculus japonicus</i> Swerby (Bai)	Muskel	—	169	—	3. gr.
26. Dez. 1941	<i>Anadara inflata</i> Reeve (Akagai)	Ganzes	0 ³⁾	144 ³⁾ [169] ³⁾	0	
15. Jan. 1942	<i>Turbo cornutus</i> Solander (Sazae)	Ganzes	0 ³⁾	39 ³⁾ [17] ²⁾	0	
9. Okt. 1941	<i>Meretrix meretrix</i> L. (Hamaguri)	Ganzes	0 ⁴⁾	(0) ¹⁾ [0] ¹⁾	—	3.
30. Nov. „	<i>Paphia philippinarum</i> Adams et Reeve (Asari)	{Fuss Kiemen Adduktor}	0 ³⁾ 0 ³⁾ 0 ³⁾	0 ³⁾ [0] ¹⁾ 0 ³⁾ [0] ¹⁾ 0 ³⁾ [0] ¹⁾	— — —	
14. Jan. 1942	<i>Viviparus melleatus</i> Reeve (Marutanisi)	Ganzes	(0) ¹⁾	(0) ¹⁾ [0] ¹⁾	—	
14. Jan. „	<i>Cristaria plicata</i> Leach. (Karasugai)	Ganzes	(0) ¹⁾	(0) ¹⁾ [0] ¹⁾	—	
23. März „	<i>Schizothaerus nuttalli</i> Conrad. (Mirukui)	{Adduktor Siphon}	(0) ¹⁾ (0) ¹⁾	(0) ¹⁾ [0] ¹⁾ (0) ¹⁾ [0] ¹⁾	— —	

¹⁾ Das zugesetzte Aneurin verschwandt.²⁾ Das zugesetzte Aneurin wurde nur teilweise wiedergefunden.³⁾ Das zugesetzte Aneurin wurde praktisch vollständig wiedergefunden.⁴⁾ Wenn man sofort nach Zusatz des Aneurins mit HCl und Natriumsulfat erhitzt und behandelt, wird das zugesetzte Aneurin vollständig wiedergefunden. Das dem Extrakt zugesetzte Aneurin geht innerhalb 30 bis 60 Minuten verloren.⁵⁾ Gewichtsprozent: Kiemen 20,2%, Adduktor 15,4% und die sonstigen Gewebe 64,4%. Absolute Aneurinmenge: Kiemen 32%, Adduktor 12% und die sonstigen Gewebe 56% des Gesamtaneurins.⁶⁾ Von S. Kawati bestimmt.

falls vollständig wiedergefunden wird. Nach diesem Versuch scheint die Substanz im unerhitztem Brei, die das zugesetzte Aneurin nach Bebrütung vollständig zerstört, thermolabil zu sein. Bei manchen Krebsen und Muscheln, wie z. B. „Kurumaebi“, „Tairagi“, „Hamaguri“, „Tanisi“, „Karasugai“ und „Mirukui“ war das dem erhitzten Extrakt zugesetzte Aneurin nicht nachzuweisen. Die etwa in diesen Extrakten vorkommende Substanz, die das Aneurin zerstört, scheint also etwas thermostabiler zu sein.

Ob die relativ thermolabilere und die relativ thermostabilere Substanz dieselbe oder verschiedene Substanzen sind, muss noch genauer erforscht werden. Bei „Kaki“ wurden die nach Bebrütung ohne Zusatz der „Takadiastase“ gefundenen Aneurinwerte kleiner als die nach Zusatz des Ferments gefundenen. Daraus ist zu schliessen, dass sich in diesen Geweben Phosphatase befindet, die aber nicht stark genug ist, um das vorliegende veresterte Aneurin unter den vorschriftsmässigen Bedingungen vollständig zu spalten.

ZUSAMMENFASSUNG.

Mit unserer fluorometrischen Methode wurde die Verteilung des Aneurins in verschiedenen tierischen Geweben und zwar von Ratten, Rindern, Menschen, sonstigen Säugetieren, Vögeln, Fischen, Krebsen, Krabben und Muscheln untersucht. Die Ergebnisse wurden tabellarisch angegeben. In vielen Krebsen, Muscheln und auch in der Haut einiger Fische wurden eine relativ thermolabilere und eine relativ thermostabilere Substanz gefunden, die das Aneurin zerstört, deren Natur zur Zeit noch unbekannt ist und weiter erforscht werden muss.

Herrn Dr. A. Fujita bin ich für seine freudliche Leitung bei dieser Arbeit zu grossem Dank verpflichtet.

LITERATUR.

- Asari (1942): Nippon Igaku, **3279**, 18.
- Fujita, Asari u. Dohi (1941): J. Biochem., **33**, 339, 359.
- Fujita u. Ebihara (1937): Biochem. Z., **290**, 201.
- Fujita u. Matsukawa (1942): J. Biochem., **35**, 89.
- Fujita u. Numata (1939): Biochem. Z., **300**, 257.

ÜBER DIE VERTEILUNG DES VITAMIN B₁ IN TIERISCHEN UND PFLANZLICHEN GEWEBEN. III.¹⁾

VON

KEIZABURO DOHI.

(Aus dem Biochemischen Laboratorium des Kitasato-Instituts
zu Tokyo. Direktor: Dr. A. Fujita.)

(Eingegangen am 25. Dezember 1941)

Im folgenden werden die Ergebnisse der Messungen über die Verteilung des Aneurins in pflanzlichen Geweben berichtet. Die Bestimmung wurde ausschliesslich nach unserer fluorometrischen Methode (Fujita, Asari und Dohi 1941) ausgeführt. Zur Untersuchung kamen aus ernährungsphysiologischem Grunde fast ausschliesslich die essbaren pflanzlichen Gewebe.

Aus Tabelle I ersieht man, dass sich im Blatt bedeutend mehr Aneurin als in Blattstiel befindet.

Aus Tabelle II geht hervor, dass unter Rhizomen und Wurzeln „Tukuneimo“, „Yatugasira“, „Yamanoimo“, „Satumaimo“ und „Ninjin“ die guten Aneurinquellen darstellen. Bei Rhizom von „Hasu“ („Renkon“) habe ich die Aneurinzerstörende Substanz gefunden, wie ich in der vorangehenden Arbeit bei Fischen und Muscheln beobachtet habe.

Aus Tabelle III ist ersichtlich, dass die Bohnen im allgemeinen sehr reich an Aneurin sind und zwar am reichsten im Embryo, dann im Endosperm, während es in Gehäuse und Samenschale sehr spärlich oder kaum zu finden ist. Bei „Kurikabotya“ ist das Aneurin in Fruchtschalen sehr reich, im Fruchtfleisch weniger und im Zentralteil mittelmässig enthalten. Im Endosperm, das von Chinesen gern gegessen wird, ist der Gehalt an Aneurin sehr hoch.

Die Ergebnisse für Obst sind in Tabelle V angegeben. In

1) Der Gesellschaft „Nippon Gakuzyuto-Sinkōkai“ danke ich für die Unterstützung dieser Arbeit. (A. Fujita).

TABELLE I.
Blätter und Stengel.

Datum	Art	Gewebe	Aneurin gehalt in γ%		frei insgesamt (%)	Bemerkungen
			frei	ins- gesamt		
15. April 1942	Petroselium sativum Hoffm. (Crandazeri, „Parsley“)	Blatt	—	168	—	3.
15. April „	Capsella Bursa-pastoris Medicus (Nazuna)	Blatt	—	164	—	6.
5. Sept. 1941	Daucus Carota L. var. sativa DC. (Ninjin)	Blatt	7,3	158	5	3.
17. April 1942	Artemisia vulgaris L. var. indica Maxim. (Yomogi)	Blatt	—	156	—	3.
20. März 1941	Spinacia oleracea L. (Hōrensō)	{ Blatt Blattstiel	130* 20*	140 20	93* 100*	Ad. ⁵⁾
13. April 1942	Plantago major L. var. asiatica Decne (Ôbako)	Blatt (haupts.)	—	138	—	4.
13. April „	Itea japonica Oliver (Suina)	Blatt (haupts.)	—	112	—	2.
8. Sept. 1941	Raphanus sativus L. var. acanthiformis Makino (Wasedaikon) aus Mino	Blatt	7	105	7	3.
4. Mai 1942	Brassica campestris L. subsp. Rapa Hook f. et Ands. (Seiyōkakabu)	Blatt	—	96	—	Ad. 2. b. w.
2. Sept. 1941	Raphanus sativus L. var. acanthiformis Makino (Tokinasidaikon)	Blatt	12	88	14	3.
4. Juli „	Brassica campestris L. var. Komatsuna Matsum. et Nakai (Komatuna) ⁴⁾	Blatt	56*	86	65*	2. b. v.
2. Mai 1942	Allium odorum L. (Nira)	Blatt	—	77 ³⁾	—	2. b.

15. April 1942	<i>Cirsium maritimum</i> Makino (Azami)	Blatt	—	74 ²⁾	—	3.
9. Jan. „	<i>Allium fistulosum</i> L. (Negi)	{ Blatt weiss grün	— — —	61 34	— —	2.
27. April „	<i>Aralia cordata</i> Thunb. (Udo)	Stengel	—	58	—	
9. Jan. „	<i>Petasites japonicus</i> Miq. (Huki)	{ Blatt Stengel	— —	52 17	— —	3.
2. Mai „	<i>Chrysanthemum coronarium</i> L. (Syungiku)	Blatt (einschl. Blattstiel)	—	52 ³⁾	—	2. b.
24. Feb. „	<i>Brassica oleracea</i> L. (Kyabetu)	Blatt	—	32	—	
26. März 1941	<i>Brassica Petsai</i> Bailey (Hakusai)	{ Blatt Blattstiel	33* 0	32 0	100* —	Ad.
1. April „	<i>Brassica japonica</i> Sieb. (Kyôna)	{ Blatt Blattstiel	18* 1,7*	16 1,7	100* 100*	
27. April 1942	<i>Brassica campestris</i> L. subsp. <i>Rapa</i> Hook fil. et Anders. (Kabu)	Blatt	—	79	—	3.
27. April „	<i>Cryptotaenia japonica</i> Hassk. (Mituba)	Blatt (einschl. Blattstiel)	—	(79) ²⁷⁾	—	
15. April „	<i>Oenanthe stolonifera</i> DC. (Seri)	Blatt (einschl. Stengel)	—	(0) ^{1,7)}	—	
15. April „	<i>Taraxacum platycarpum</i> Dahlst. (Tanpopo)	Blatt	—	(0) ²⁾	—	6.
20. April „	<i>Saxifraga stolonifera</i> Meerb. (Yukinosita)	Blatt	—	(0) ¹⁾	—	6.
17. April „	<i>Polygonum Reynoutria</i> Makino (Itadori)	Blatt	—	(0) ^{1,6)}	—	7.
13. April „	<i>Pteridium aquilinum</i> Kuhn (Warabi)	{ Sprössling Stengel Blatt	— — —	0 ³⁾ 0 ³⁾	— —	2. 4.

²⁾ Das zugesetzte Aneurin verschwand.³⁾ Das zugesetzte Aneurin wurde nur teilweise wiedergefunden.⁴⁾ Das zugesetzte Aneurin wurde vollständig wiedergefunden.⁵⁾ Von S. Kawati bestimmt.⁶⁾ Nach Adsorption bestimmt.⁷⁾ Nach NaOH-Zusatz wurde der Extrakt braun.⁸⁾ Nach NaOH-Zusatz wurde der Extrakt grün.

TABELLE II.
Rhizome und Wurzeln.

Datum	Art	Gewebe	Aneuringehalt in %		frei insgesamt (%)	Bemerkungen
			frei	ins- gesamt		
20. April 1942	Dioscorea Batatas Decne (Tukuneimo)	Wurzelknolle	—	156 ³⁾	—	2.
10. März ,	Colocassia Antiquorum Schott var. esculenta Engl. (Yatugasira)	Knolle (einschl. Schale)	—	119 ³⁾	—	
30. April ,	Dioscorea japonica Thunb. (Yamanaimo)	Wurzelknolle (einschl. Schale)	—	118 ³⁾	—	2. gr. b. w.
17. April ,	Lycoris radiata Herb. (Higanhana)	Zwiebel	—	99 ³⁾	—	3.
24. Feb. ,	Ipomoea Batatas Lam. var. edulis Makino (Satumaimo)	Wurzelknolle	—	97 ³⁾	—	
28. März 1941	" "	{ Schale { Fleisch	86* 83*	86 83	100* 100*	
30. Juni ,	Daucus Carota L. var. sativa DC. (Ninjin) ⁴⁾	Wurzel { äuss. T. { (stark rot) { zentr. T. { (orangerot)	78* 43*	95 ³⁾ 48 ³⁾	82* 89*	3. 2.
29. Mai ,	Allium sativum L. forma pekinense Makino (Ninniku) ⁴⁾	Stengel mit Blattstiell { Zwiebel { ohne Schale	76* 71*	93 75	82* 95*	3. gr. v.
17. Juni 1942	" "	Zwiebel	—	156 ³⁾	—	4. b.
4. Mai ,	Brassica campestris L. subsp. Rapa Hook f. et Ands. (Seiyô-akakabu)	Wurzel	—	79 ²⁾	—	Ad. 2. b. w.
27. April ,	" " (Kabu)	Wurzel (einschl. Schale)	—	78 ³⁾	—	1.
3. Juli 1941	Solanum tuberosum L. (Zyagaimo) ⁴⁾	Knolle	61	69	89	2. b. br.

9. Mai 1942	Phyllostachys edulis A. et C. Riv. (Môsôtiku)	Sprössling (ausschl. Blätter) {obere Hälfte {untere „	—	169 ³⁾ 59 ³⁾	—	—	2. b. w. 2. b. w.
26. Feb. ,	Colocasia Anti- quorum Schott var. esculenta Engl. (Satoimo)	Knolle (einschl. Schale)	—	51	—	—	
12. März ,	Allium Cepa L. (Tananegi)	Zwiebel	—	26	—	—	
27. April ,	Wasabia Wasabi Makino (Wasabi)	Wurzel	—	25 ³⁾	—	—	2.
8. Jan. ,	Raphanus sativus L. var. acanthi- formis Makino (Daikon)	Wurzel	—	15	—	—	
24. Feb. ,	Zingiber offici- nale Rosc. (Syôga)	Wurzel	—	0	—	—	
23. April ,	Nelumbo nuci- fera Gaertn. (Hasu)	Rhizom	0 ¹⁾	0 ²⁾	—	—	
28. Jan. ,	Arctium Lappa L. (Gobô)	Wurzel	—	34	—	—	

¹⁾ Das zugesetzte Aneurin verschwand.²⁾ Das zugesetzte Aneurin wurde nur teilweise wiedergefunden.³⁾ Das zugesetzte Aneurin wurde vollständig wiedergefunden.⁴⁾ Von S. Kawati bestimmt.

TABELLE III.
Bohnen und Melonen.

Datum	Art	Gewebe	Aneuringehalt in %		frei insgesamt (%)	Bemer- kungen
			frei	ins- gesamt		
9. Juni 1941	Glycine Max Merrill (Daizu) ³⁾	Samenschale	368*	449	82*	3. g. gr.
		Endosperm	630*	1040	65*	1.
		Embryo	1370*	1620	85*	1.
9. April 1942	"	Ganze Samen	657*	1030	64*	1.
		{ Ganze Samen (weiss, trocken)	—	422	—	3.
9. April	"	{ "schwarz" "	—	312	—	Ad. 3.

7. Mai 1941	"	" ³⁾	Mehl(Kinako)	265*	973	27*	B. F. ⁶⁾ g. (stärker als H.v. ⁷⁾
8. Jan. 1942	Arachis hypogaea L. (Nankin-mame) frisch	{ Embryo Endosperm Samenschale	870 350 0 ²	1515[845] 750[800] 0 ² [0] ¹	57 47 —		
30. Jan. "	Pisum sativum L. (Aoendō)	Ganze Samen (trocken)	—	578	—	—	3.
9. April "	" "	" "	—	666	—	—	
9. Juni "	Phaseolus angularis Wight (Azuki)	Ganze Samen (trocken)	—	532	—	—	
		{ Gehäuse Samenschale	32*	38	84*	Ad. 3. r.	
30. Juni 1941	Vicia Faba L. (Soramame) frisch ⁵⁾	{ (grüner T.) " (gelber T.) " „Heta“) Endosperm Embryo Ganze Samen	60* 186* 233* 916* 194*	60 223 590 980 475	100* 84* 39* 94* 60*	Ad. 4. r. 4. 3. g. w. 1. g.	
30. April 1942	Pisum sativum L. var. arvense Poir (Sayaeda)	{ Ganze Hülse Bohnen	— —	156 426	— —	—	2. gr.b.w. 3. gr.b.w.
1. Jan. "	Ginkgo biloba L. (Ginnan)	{ Endosperm Samenschale	131 0 ¹	328[328] 0[0] ¹	40	—	
9. April "	Phaseolus coccineus L. var. albus Bailey (Siroingen)	Ganze Samen (trocken)	—	300	—	—	3.
9. Mai 1941	Pisum sativum L. ("græn peas" ⁴⁾)	{ Gehäuse Samenschale Endosperm Embryo Ganze Samen	18* 29* 200* 310* 280*	20 28 234 343 300	90* 100* 85* 90* 93*	Ad. 2. r.	
7. Mai 1942	Sesamum indicum L. (Sirogoma)	Ganze Samen	—	261	—	—	2. b. w.
24. Dez. 1941	" (Kurogoma)"	Ganze Samen	258	250[328]	100	—	
29. Juni 1942	Phaseolus vulgaris L. (Ingen-mame)	Hülse	—	97	—	—	2. b.
19. Juli 1941	Licopersicon esculentum Mill. (Tomato) ³⁾	Fruchtfleisch	54	68	65	—	2.
18. Mai 1942	" "	{ Fruchtfleisch Zentralteil (einschl. Samen)	—	25	—	—	3. v. b.
			—	66	—	—	3. v. b.

29. Juni	"	Cucurbita moschata Duch. var. melonae- formis Makino (Kabotya)	Schale Fleisch Zentralteil	— — —	181 66 84	— — —	2. gr. g. 2. g. 2. gr.
7. Nov. 1941		Cucurbita Pepo L. (Kurikabotya)	Schale Fleisch Zentralteil (ausschl. Samen) Samen (ausschl. Schale)	31 13 39 162	136 [153] 44 [39] 74 [100] 515 [534]	23 31 53 31	2. 2. 2. 2.
8. Juni 1942		Vigna Catiang Endl. var. sinensis King forma sesquipedalis Makino (Zyūrokusasage)	Hülse (jung)	—	56	—	2. gr. b.
9. Juli	"	Glycine Max Merrill. (Kuro- mame)	Angekeimte Bohnen (Moyasi) Endosperm Stengel Wurzel	— — —	262 45 78	— — —	2. b. 2. b. 2. b.
13. Sept. 1941		Cucumis sativus L. (Kiuri)	Schale Fleisch Zentralteil (einschl. Samen)	16 8 19	* 45 23 58	35 35 32	
8. Juni 1942		Cucumis Melo L. var. Conomon Makino (Sirouri)	Schale (Fleisch)	— —	23 21	— —	2. gr. b. 2. gr. b.

¹⁾ Das zugesetzte Aneurin verschwand.²⁾ Das zugesetzte Aneurin wurde nur teilweise wiedergefunden.³⁾ Von S. Kawati bestimmt.⁴⁾ Gewichtsprozent: Endosperm 91,8%, Samenschale 6,2%, und Embryo 2,0%. Absolute Aneurinmenge pro 100 g Bohnen; Endosperm 955γ, Samenschale 28,3γ und Embryo 32,4γ.⁵⁾ Gewichtsprozent: Schale (grüner Teil) 21,8%, Schale (gelber Teil, „Heta“) 1,6%, Endosperm 76,3% und Embryo 0,3%. In Schale befindet sich 2,8%, in „Heta“ 0,8%, in Endosperm 95,8% und in Embryo 0,6% des Gesamtaneurins.⁶⁾ Blindfluorescenz. ⁷⁾ Hauptversuch.

TABELLE IV.
Blumen.

Datum	Art	Gewebe	Aneuringehalt in γ%		frei insgesamt (%)	Bemerkungen
			frei	ins- gesamt		
8. April 1941	<i>Prunus donarium</i> Sieb. (Sakura)	Blumen- blätter Sonstige Teile	39	72	54	
			75	89	84	

TABELLE V.
Obst.

Datum	Art	Gewebe	Aneuringehalt in γ%		frei insgesamt (%)	Bemerkungen
			frei	ins- gesamt		
5. März 1941	<i>Citrus deliciosa</i> Tenore (Mikan)	Schale Frucht- fleisch (ausschl. Endocarp)	32*	49	65*	B.F. st. ²⁾
			105*	105	100*	
13. März	„	<i>Citrus Aurantium</i> L. var. <i>poonensis</i> Hayata (Ponkan) aus Kagoshima	Schale	32*	38	B.F. st.
			Frucht- fleisch	90*	88	
11. Juni 1942	<i>Cucumis Melo L.</i> ("melon")	Frucht- fleisch Zentralteil (ausschl. Samen)	—	63	—	3. gr. b.
			—	256	—	
18. März 1941	<i>Citrus Aurantium</i> L. ("navel orange")	Schale Frucht- fleisch	38*	46	83*	Ad. B.F. st. B.F. st.
			58*	58	100*	
30. Okt.	„	<i>Citrus medica L.</i> subsp. <i>Limonum</i> Hook fil. ("lemon")	Öldrüsens- schicht	13	28[28]	Ad. 4. B.F. st. " "
			Mesocarp Fruchtfleisch (einschl. Endocarp)	0	0	
30. Okt.	„	<i>Citrus grandis</i> Osbeck (Zabon) aus Kagoshima	20	40[38]	50	" " B.F. st. (b. gr.) " "
			Öldrüsens- schicht	18	35[36]	
			Mesocarp Fruchtfleisch (ausschl. Endocarp)	0	0	
			13	34[34]	39	Ad. 4.

14. Mai 1942	Musa paradisiaca L. var. sapientum O. Kuntze (Banana)	Fruchtfleisch	—	33	—	2. b. w
11. Juni ,	Prunus Cerasus L. (Ötö)	Fruchtfleisch (ausschl. Samen)	—	29	—	4. gr. b.
11. Juni ,	Eriobotrya japonica Lindl. (Biwa)	Fruchtfleisch	—	28 ¹⁾	—	4. gr. b.
23. Mai ,	" "	" "	—	23	—	2. v. b.
6. Juni ,	Prunus Mume Sieb. et Zucc. (Ume)	Fruchtfleisch (einschl. Schale)	—	39 ¹⁾	—	2. b. gr.
4. Juli 1941	unreif "	" "	11*	12	92*	3. b. gr.
3. Juli ,	Prunus salicina Lindl. (Sumomo)	Fruchtfleisch mit Schale (ausschl. Samen)	13*	15	87*	2.
14. Jan. 1942	Malus pumila Mill. var. dulcisima Koidz. (Ringo)	Fruchtfleisch	—	13	—	
6. Juni ,	Pyrus Simonii Carr. (Nasi)	{ Fruchtfleisch Schale	—	12	—	1. b. w.
9. Mai ,	Fragaria grandiflora Ehrl. (Itigo)	Ganzes	—	6	—	3. b.
				8	—	Ad. 2.

¹⁾ Das zugesetzte Aneurin wurde teilweise wiedergefunden.²⁾ Stark.

TABELLE VI.
Algen (Trockenpräparate).

Datum	Art	Gewebe	Aneuringehalt in γ%		frei insgesamt (%)	Bemerkungen
			frei	ins- gesamt		
20. Juli 1941	Porphyra tenera Kjellman (Asa- kusanori) aus Tokyowan	Blatt	146*	167	88*	Ad. 2. r.
23. Juni 1942	Undaria pinnati- fida Suringar (Wakame)	"	—	138	—	4. gr.

29. Mai	"	Laminaria japonica Areschoug (Konbu)	Blatt	—	119	—	3. gr. w.
23. Juni	"	Enteromorpha intestinalis Link (Aonori) aus Tamagawa	"	31*	63	49*	Ad. 1. r.
23. Juni	"	Hizikia fusiforme Okamura (Hiziki)	"	—	37	—	Ad. 4. gr. B.F. st. ¹⁾

¹⁾ Nach NaOH-Zusatz wurde der Extrakt braun.

TABELLE VII.

Pilze.

Datum	Art	Gewebe	Aneuringehalt in γ%		frei insgesamt (%)	Bemer- kungen
			frei	ins- gesamt		
3. Okt. 1941	Tricholoma conglobatum Vitt. (Simezi) reif	{ Hut Stengel Ganzes	40	117	34	4. g. gr.
			13	14	94	
			29	77	38	
3. Okt.	Armillaria Matsudake Ito et Imai (Matudake) unreif	{ Hut Stengel	17	91	18	4. g. gr.
			4	11	37	
			10	48	21	
10. Juli	Cortinarius Shiitake P. Henn. (Shiitake) trocken	Hut	128	150	85	Ad. 2. g. gr.

TABELLE VIII.

Tees.

Datum	Art	Aneuringehalt in γ%		frei insgesamt (%)	Bemer- kungen
		frei	ins- gesamt		
10. Juli 1941	Grüner Tee (Sentya)	17*	243	7*	A d. 3.r.
" "	" " (Matty)	49*	130	8*	A d. 2.r.
" "	" " (Bantya)	16*	88	18*	Ad. 3.r.
" "	Schwarzer Tee (Kötya)	12*	88	14*	Ad. 21.

TABELLE IX.
Getreide.

Datum	Art	Gewebe	Aneurin gehalt in %		frei insgesamt (%)	Bemerkungen
			frei	ins- gesamt		
7. Juli 1941	Dryza sativa L. (Genmai) unpoliert ¹⁾	{ Embryo Endosperm Ganzes	8680* 195* 400*	9770 321 530	99* 61* 75*	2. r. w. 1. b. v. 1. b. v.
24. März "	" "	{ Embryo (Menzai)	8500*	8000	100*	
5. März "	" "	{ Kleie (Nuka)	2950*	2980	100*	2.
7. Mai "	" "	"	—	3560	—	2.
5. März 1942	" "					
1. Juli 1941	Panicum miliaceum L. (Motikibi) halb poliert	{ Ganzes Korn	410*	618	66*	3. gr. g. St. B.F. gr.
2. April 1942	Panicum Crusgalli L. var. frumentaceum Trin. (Hie)	Korn (entschält)	—	536	—	1. gr. b.
23. April "	Triticum aesti- vum L. (Komugi)	Ganzes Korn	—	398	—	1.
17. März "	" "	{ Weizen- mehl (Udonko)	—	328	—	
17. März "	" "	{ " (Merikenko)	—	23	—	
9. April "	Setaria italica Beauv. (Awa)	{ Ganzes Korn (poliert)	—	429	—	3.
" "	" "	{ " (einschl. Samenschale)	—	426	—	3.
17. April "	Fagopyrum esculen- tum Moench. (Soba)	{ " (einschl. Samenschale)	—	301	—	2.
12. März "	" "	Mehl (Sobako)	—	516	—	

¹⁾ Gewichtsmässig: 2,6% Embryo und 97,4% Endosperm. Absolute Aneurinmenge: 54% des Gesamtaneurins (226γ pro 100 g Reis) in Embryo und 46% (190γ pro 100 g Reis) in Endosperm.

Citronenarten befindet sich das Aneurin mehr im Fruchtfleisch als im Schalenteil. Im Mesocarp ist das Aneurin kaum zu finden und in der Oldrüsenschicht ist der Gehalt fast ebenso gross oder etwas kleiner als im Fruchtfleisch. Gerade umgekehrt ist der Verhältnis bei Vitamin C (Vgl. Fujita und Ebihara 1939).

In Tabelle V befinden sich die Ergebnisse von Trockenalgen, die sich auch als aneurinreich erwiesen.

Einige Bestimmungen bei mehreren essbaren Pilzarten werden in Tabelle VI angeführt. Es zeigt sich, dass der Hut viel mehr Aneurin enthält als der Stiel.

Aus den Ergebnissen für Tee in Tabelle VIII ist ersichtlich, dass die japanischen grünen Teearten ziemlich reich an Aneurin sind.

Aus den Ergebnissen für Getreide in Tabelle IX ersieht man, dass das Aneurin im Embryo sehr konzentriert vorkommt und zwar etwa 27 mal so viel wie im Endosperm. Da aber der Embryo gewichtsmässig etwa 2,6% des Reises ausmacht, so beträgt die absolute Aneurinmenge des Embryos etwa 54% des Gesamtaneurins. Auch erkennt man daraus, dass „Kibi“, „Hie“, „Awa“, „Komugi“ und „Soba“ gute Aneurinquellen darstellen.

*

ZUSAMMENFASSUNG.

Die Ergebnisse der Bestimmungen über die Verteilung des Aneurins in verschiedenen essbaren pflanzlichen Geweben und zwar in vielen Gemüsen, Obstarten und Getreidarten wurden tabellarisch angegeben und die Besonderheiten besprochen.

Herrn Dr. A. Fujita bin ich für seine freudliche Leitung bei dieser Arbeit zu grossem Dank verpflichtet.

LITERATUR.

- Fujita, Asari u. Dohi (1941): J. Biochem., **33**, 339, 359.
 Fujita u. Ebihara (1939): Biochem. Z., **300**, 143.

INDEX TO VOLUME 35.

A

- AJISAKA, Masanobu. Über die Bestimmung des Provitamin A. II. Bestimmung des Kryptoxanthins. 119.
 Alligatorschildkrötengalle, Über eine isomere Cholsäure, Heterocholsäure aus der ——. 409.
 Alligatorschildkrötengalle, Über die ——. 155, 173, 233.
 AMANO, Masaharu. Über den Stoffwechsel bei niedriger Temperatur. I. Mitteilung: Über den Zusammenhang zwischen niedriger Temperatur und dem Serumkephalin. 219.
 Antibody, Studies on the —— producing substance. 307.
 Antigen, Studies on the heterogenetic ——. 307.

B

- B₁-Avitaminose, Über die —— bei kohlehydratfreier Fettdiät. 9.
 Bisnor-cholsäure, Über den Abbau des Trioxy-steriocholansäurelaktons bis zur ——. 3.7.12-Trioxypregnan-20-on und 3.7.12-Trioxypäthiocholansäure. 173.
 Blutphosphatid, Studien über das ——. 67.
 Blutplasma, Über ihre Wirkung auf die Menge der Fraktionen des Eiweißes im —— des Kaninchens. 203.
 Blutzucker, Über ihre Wirkung auf den —— des Kaninchens. 193.

C

- Carbohydrazine, Studien über die ——.

39.

- Carboxypeptidase, Studies on ——. 103.
 Charcoal, Reaction between ammonia and amino compound in the presence of ——. 379.
 Chaulmoograöl, Über den Einfluss des ——s auf die Phosphorverbindungen im Blute. 133.
 Chaulmoograöl, Über den Stoffwechsel des mit —— injizierten Tieres. 193, 203.
 Chaulmoograöl-injektion, Über den Stoffwechsel der Tiere bei der ——. 133.
 Chaulmoograöl, Über die Ablagerung des ——s in den Organen. 61.
 Cholsäure, Über eine isomere ——, Heterocholsäure aus der Alligatorschildkrötengalle. 409.

D

- Dehydrochenodesoxycholsäure, Bildung von α - und β -3-Oxy-7-ketocholansäure aus —— im Krötenorganismus. 413.
 DOHI, Keizaburo. Über die Verteilung des Vitamin B₁ in tierischen und pflanzlichen Geweben. II. 419. III. 431.

E

- Emulsin-Typus, Über β -Glukosidase und β -Galaktosidase von Taka- und ——. 39.

F

- FUJIMURA, Shiro. Further studies on the organ specificity. 25.

- FUJIMURA, Shiro. Studies on the heterogenetic antigen. III. Studies on the antibody producing substance. 307.
- FUJITA, Akiji und Danji MATSUKAWA. Bemerkungen über die kolorimetrische Bestimmung des Vitamin B₁ in tierischen und pflanzlichen Geweben. 79.
- FUJITA, Akiji und Danji MATSUKAWA. Über die Verteilung des Vitamin B₁ in tierischen und pflanzlichen Geweben. I. 89.
- FUKE, Fujio. Studien über Polysaccharide aus pathogenen Pilzen. III. Mitteilung. 259.
- IV. Mitteilung. 263.

G

- β -Galaktosidase, Über β -Glukosidase und — von Taka- und Emulsin-Typus. 39.
- β -Glukosidase, Über — und β -Galaktosidase von Taka- und Emulsin-Typus. 39.
- Glyoxalase, Über einen Inhibitor der —. 351.
- Guanidine-body, Biochemical studies on — - - - -ies. 379.

H

- Heterocholsäure, Über eine isomere Cholsäure, — aus der Alligatorschildkrötengalle. 409.
- HORIKOSHI, Katsumi. Studien über die Carbohydrase. 5. Mitteilung. Über β -Glukosidase und β -Galaktosidase von Taka- und Emulsin-Typus. 39.
- HUKASAKO, Tetsuo. Studien über das Blutphosphatid. I. Mitteilung. Über die Beziehung zwischen den Serumphosphatiden und den Fraktionen des Serumweißes. 67.

I

- ISHIMOTO, Kiyomatsu. Über einen Inhibitor der Glyoxalase. 351.
- IWAKI, Kanji. Über das Schicksal des Pentaoybufostans im Meerschweinchenerorganismus. 225.
- IWAKI, Kanji. Über das Schicksal der Trioxy-bufosterochalensäure im Meerschweinchenerorganismus. 139.
- IWAKI, Kanji. Über das Schicksal der Trioxy-isosterocholensäure im Kaninchenorganismus. 149.

K

- Kolorimetrische Bestimmung, Bemerkungen über die — — — des Vitamin B₁ in tierischen und pflanzlichen Geweben. 79.
- KANAZAWA, Koichi. Über den Stoffwechsel des mit Chaulmoograöl injizierten Tieres. Über ihre Wirkung auf die Menge der Fraktionen des Eiweißes im Blutplasma des Kaninchens. 203.
- KANEMITSU, Tsutomu. Bildung von α - und β -Oxy-7-ketocholansäure aus Dehydrochenodesoxycholsäure im Krötenorganismus. 413.

- KANEMITSU, Tsutomu. Über die Alligatorschildkrötengalle. III. Über die chemische Konstitution des Trioxy-sterocholansäurelaktons. 155.
- IV. Über den Abbau des Trioxy-sterocholansäurelaktons bis zur Bisnor-cholsäure, 3,7,12-Trioxy-pregnan-20-on und 3,7,12-Trioxy-äthiocholansäure. 173.
- KANEMITSU, Tsutomu. Über eine isomere Cholsäure, Heterocholsäure aus der Alligatorschildkrötengalle. 409.
- β -Ketocarbonsäure, Über die katalytische Decarboxylierung der — — —.

293.
Kohlehydratstoffwechsel, Experimentelle Untersuchungen über die Beziehungen zwischen B-Vitamin und —. 325.
KOYANAGI, Jokichi. Über die Ablagerung des Chaulmoograöls in den Organen. 61.
KOYANAGI, Jokichi. Über des Stoffwechsel der Tiere bei der Chaulmoograöl-injektion. Über den Einfluss des Chaulmoograöls auf die Phosphorverbindungen im Blute. 133.
Kryptoxanthin, Bestimmung des ——s. 119.
KUGA, Tori. Über die katalytische Decarboxylierung der β -Keto-carbonsäure. 293.

L

- Leberglykogen**, Über — bei kohlehydratfreier Fettdiät. 1.
Leucyl-isoserin, Über racemische Isomere des ——s. 187.

O

- OKUGAWA**, Yuzo. Experimentelle Untersuchungen über die Beziehungen zwischen B-Vitamin und Kohlehydratstoffwechsel. 325.
 α -3-Oxy-7-ketocholansäure, Bildung von — und β -3-Oxy-7-ketocholansäure aus Dehydrochenodesoxycholsäure im Krötenorganismus. 413.
 β -3-Oxy-7-ketocholansäure, Bildung von α - und — aus Dehydrochenodesoxycholsäure im Krötenorganismus. 413.
Organ specificity, Further studies on the ——. 25.
OZAWA, Ryoji. Über den Stoffwechsel des mit Chaulmoograöl injizierten

Tieres. Über ihre Wirkung auf den Blutzucker des Kaninchens. 193.

P

- Pentaoxy-bufostan**. Über das Schicksal des ——s. im Meerschweinchenorganismus. 225.
Pilz, Studien über Polysaccharide aus pathogenen ——en. 259, 263.
Polysaccharid, Studien über ——e aus pathogenen Pilzen. 259, 263.
Provitamin A, Über die Bestimmung des ——. 119.

R

- Rice**, Biochemical studies on the —— of Chosen. 393.
Rice-bran, On the fat of the ——. 393.

S

- SAITO**, Hisasi. Studies on tyrosinase. VII. The action of the potatoe tyrosinase on trihydric phenols. 243.
SEIKI, Yoshinori. Über racemische Isomere des Leucyl-isoserins. 187.
Serumeiweiss, Über die Beziehung zwischen den Serumphosphatiden und den Fraktionen des ——es. 67.
Serumkephalin, Über den Zusammenhang zwischen niedriger Temperatur und dem ——. 219.
Serumphosphatid, Über die Beziehung zwischen den ——en und den Fraktionen des Serumeiweisses. 67.
SHIBUYA, Shinichi. Biochemical studies on guanidine-bodies. I. Reaction between ammonia and amino compound in the presence of charcoal. 379.
SUEYOSHI, Yuji und Kikusuke Too-

- YAMA. Über die Zuckerbildung aus Fett im Tierkörper. I. Mitteilung: Über Leberglykogen bei kohlehydratfreier Fettdiät. 1.
- SUGANAMI, Takeo und Kazumi, YAMASAKI. Über die Alligatorschildkrötengalle. II. Trioxy-stero- und Trioxy-isostero-cholansäurelakton. 233.
- T**
- Takadiastase, Beitrag zur Kenntnis der ——. 281.
- Taka-Typus, Über β -Glukosidase und β -Galaktosidase von —— und Emulsin-Typus. 39.
- Temperatur, Über den Stoffwechsel bei niedriger ——. 219.
- TOKUNAGA, Kazuo. Beitrag zur Kenntnis der Takadiastase. 281.
- TOOYAMA, Kikusuke. Über die Zuckerbildung aus Fett im Tierkörper. II. Mitteilung. Über die Bi-Avitaminose bei kohlehydratfreier Fettdiät. 9.
- Trihydric phenol, The action of the potatoe tyrosinase on —— ——s. 243.
- 3.7.12-Trioxy-äthiocholansäure, Über den Abbau des Trioxy-sterocholan-säurelaktons bis zur Bisnor-cholsäure, 3.7.12-Trioxy-pregnan-20-on und ——. 173.
- Trioxy-bufosterocholansäure, Über das Schicksal der —— im Meerschweinchenorganismus. 139.
- Trioxy-isosterocholansäurelakton, Trioxy-stero-cholansäurelakton und ——. 233.
- Trioxy-isosterocholensäure, Über das Schicksal der —— im Kaninchenorganismus. 149.
- 3.7.12-Trioxy-pregnan-20-on, Über den Abbau des Trioxy-sterocholan-säurelaktons bis zur Bisnor-cholsäure, —— und 3.7.12-Trioxy-äthiocholansäure. 173.
- Trioxy-sterocholansäurelakton, —— und Trioxy-isosterocholansäurelakton. 233.
- , Über den Abbau des ——s bis zur Bisnor-cholsäure, 3.7.12-Trioxy-pregnan-20-on und 3.7.12-Trioxy-äthiocholansäure. 173.
- , Über die chemische Konstitution des ——s. 155.
- Tyrosinase, Studies on ——. 243.
- U**
- UTSUNOMIYA, Takefumi. Studies on carboxypeptidase. 103.
- V**
- B-Vitamin, Experimentelle Untersuchungen über die Beziehungen zwischen —— und Kohlehydratstoffwechsel. 325.
- Vitamin B₁, Bemerkungen über die kolorimetrische Bestimmung des —— in tierischen und pflanzlichen Geweben. 79.
- , Über die Verteilung des —— in tierischen und pflanzlichen Geweben. 89, 419, 431.
- Y**
- YAMASAKI, Seiko. Biochemical studies on the rice of Chosen III. On the fat of the rice-bran. 393.
- Z**
- Zuckerbildung, Über die —— aus Fett im Tierkörper. 1, 9.

